



Università degli Studi di Cagliari  
Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico

**DOTTORATO DI RICERCA IN:  
SCIENZE E TECNOLOGIE FARMACEUTICHE**

Ciclo XXIII

S. S. D. CHIM/09

PREPARAZIONE, CARATTERIZZAZIONE E STUDIO DI  
STABILITA' DI NUOVI DRUG DELIVERY SYSTEMS:  
MAGNETOLIPOSOMI E NANOPARTICELLE DI CHITOSANO

Presentata da: Alice Floris

Coordinatore Dottorato: Prof. Elias Maccioni

Relatore: Prof.ssa Chiara Sinico

Esame finale anno accademico 2009 - 2010



---

*A tutte le persone che hanno creduto in me e che mi hanno aiutato e sostenuto sempre.*

---

---

---





---

## INDICE

<b>1. Introduzione</b>	2
<i>1.1. Nanoscienza, Nanotecnologia e Nanomedicina</i>	2
<i>1.2. Drug delivery systems: obiettivi e prospettive</i>	6
<i>1.3. I magnetoliposomi</i>	8
<i>1.4. Le nanoparticelle di chitosano</i>	13
<i>Bibliografia</i>	17
<b>2. I magnetoliposomi</b>	20
<i>2.1. Scopo del lavoro</i>	20
<i>2.2. Parte sperimentale</i>	20
2.2.1. <i>Materiali</i>	20
2.2.2. <i>Sintesi delle nanoparticelle magnetiche</i>	21
2.2.2.1. <i>Sintesi delle HL_SPION</i>	21
2.2.2.2. <i>Sintesi delle HB_SPION</i>	22
2.2.2.3. <i>Sintesi delle nanoparticelle Nanogap<sup>®</sup></i>	23
2.2.3. <i>Preparazione dei liposomi e dei magnetoliposomi</i>	23
2.2.3.1. <i>Preparazione dei magnetoliposomi con le HL_SPION</i> <i>(MLP_HL)</i>	24
2.2.3.2. <i>Preparazione dei magnetoliposomi con le HB_SPION</i> <i>(MLP_HBC<sub>6</sub>H<sub>14</sub> e MLP_HB)</i>	24
2.2.3.3. <i>Preparazione dei magnetoliposomi con le nanoparticelle</i> <i>Nanogap<sup>®</sup> (MLP_Ngp)</i>	25
2.2.4. <i>Purificazione dei magnetoliposomi</i>	25
2.2.5. <i>Analisi quantitativa della magnetite</i>	27
2.2.5.1. <i>Analisi diretta della magnetite sul ferrofluido acido</i> <i>(HL_SPION) e sui relativi magnetoliposomi (MLP_HL)</i>	27
2.2.5.2. <i>Analisi del Ferro (II) mediante saggio della o-fenantrolina</i>	28
2.2.5.2.1. <i>Procedura operativa</i>	28
2.2.5.2.2. <i>Costruzione della retta di taratura</i>	29
2.2.5.2.3. <i>Applicazione del saggio ai magnetoliposomi</i>	30
2.2.5.2.4. <i>Problematiche legate all'uso dell'etanolo</i>	31
2.2.5.2.5. <i>Esperimenti di approfondimento sul saggio della</i> <i>o-fenantrolina applicato ai magnetoliposomi</i>	33
2.2.6. <i>Associazione magnetite-liposomi (%) (LMA %)</i>	34

---

2.2.7. Distribuzione % della magnetite nei centrifugati	35
2.2.8. Liofilizzazione dei magnetoliposomi	35
2.2.9. Caratterizzazione dei magnetoliposomi	36
2.2.9.1. DLLS, indice di polidispersione e potenziale zeta	36
2.2.9.2. Analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)	37
<b>2.3. Risultati e discussione</b>	38
2.3.1. Caratterizzazione DLLS e TEM delle SPION	38
2.3.1.1. Le HL_SPION	38
2.3.1.2. Le HB_SPION	40
2.3.1.3. Le HB_Ngp	43
2.3.2. Rette di taratura magnetite	44
2.3.2.1. Valutazione diretta delle HL_SPION allo spettrofotometro UV-Vis	44
2.3.2.2. Saggio della o-fenantrolina	46
2.3.2.2.1. La retta di taratura della magnetite standard	46
2.3.2.2.2. Sostituzione dell'acqua con etanolo	48
2.3.2.2.3. Confronto tra le varie rette di taratura e ulteriori approfondimenti	50
2.3.3. Le formulazioni magnetoliposomiali	52
2.3.3.1. Analisi MLP_HL – fase 1	52
2.3.3.1.1. Caratterizzazione MLP_HL ad alta concentrazione (MLP_HL <sub>HC</sub> )	52
2.3.3.1.2. Conclusioni	61
2.3.3.2. Analisi MLP_HL – fase 2	61
2.3.3.2.1. Caratterizzazione MLP_HL 1,2,3, - miscela Ferrofluido/acqua	61
2.3.3.2.2. Conclusioni	70
2.3.3.3. Analisi MLP_HL – fase 3	70
2.3.3.3.1. Caratterizzazione MLP_HL 1, 1*, 2, 3, 4 – miscela Ferrofluido/tampone fosfato	71
2.3.3.3.2. Conclusioni	77
2.3.3.4. Analisi MLP_HB – fase 1	79
2.3.3.4.1. Caratterizzazione MLP_HBC <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	79
2.3.3.4.2. Conclusioni	86
2.3.3.5. Analisi MLP_HB – fase 2	87

2.3.3.5.1. Caratterizzazione MLP_HB	87
2.3.3.5.2. Conclusioni	95
2.3.3.6. Analisi MLP_Ngp – fase 1	96
2.3.3.6.1. Caratterizzazione MLP_Ngp	97
2.3.3.6.2. Conclusioni	105
2.3.3.7. Analisi MLP_Ngp – fase 2	106
2.3.3.7.1. Caratterizzazione MLP_Ngp	106
2.3.3.7.2. Conclusioni	120
2.3.3.8. Analisi MLP_Ngp – fase 3	120
2.3.3.8.1. Caratterizzazione MLP_Ngp	121
2.3.3.8.2. Conclusioni	125
2.3.4. Valutazioni conclusive generali	126
2.3.5. Conclusioni e propositi futuri	127
<b>Ringraziamenti</b>	129
<b>Bibliografia</b>	130
<b>3. Studi in vitro sui magnetoliposomi</b>	133
3.1. Scopo del lavoro	133
3.2. Parte sperimentale	134
3.2.1. Materiali	134
3.2.2. Preparazione dei liposomi e dei magnetoliposomi	134
3.2.3. Caratterizzazione dei magnetoliposomi	135
3.2.3.1. DLLS, indice di polidispersione, potenziale zeta e analisi morfologica (TEM)	135
3.2.3.2. Saggio della o-fenantrolina sui magnetoliposomi	135
3.2.3.3. Valutazione della separazione dei magnetoliposomi e della magnetite mediante l'utilizzo di un magnete permanente	136
3.2.4. Colture cellulari	138
3.2.5. Saggi di citotossicità	138
3.2.5.1. Il saggio del Trypan Blue	139
3.2.6. Visualizzazione del ferro internalizzato alle cellule: saggio del Blu di Prussia	139
3.2.7. Saggio della o-fenantrolina sulle cellule	140
3.3. Risultati e discussione	142
3.3.1. Caratterizzazione $Lp_{cell}$ ed MLP_Ngp5 <sub>cell</sub>	142
3.3.2. Separazione dei magnetoliposomi e della magnetite mediante	

<i>l'utilizzo del magnete BD<sup>TM</sup> Imagnet</i>	157
<i>3.3.3. Valutazioni preliminari agli esperimenti di citotossicità</i>	159
<i>3.3.4. Il saggio del Trypan Blue</i>	162
<i>3.3.4.1. Prima sessione sperimentale</i>	162
<i>3.3.4.2. Seconda sessione sperimentale</i>	165
<i>3.3.5. Visualizzazione del ferro internalizzato mediante il saggio del blu di prussia</i>	170
<i>3.3.6. Valutazione dell'uptake cellulare mediante esecuzione del saggio della o-fenantrolina sulle cellule</i>	174
<b>3.4. Conclusioni e propositi futuri</b>	179
<b>Ringraziamenti</b>	180
<b>Bibliografia</b>	181
<b>4. Le nanoparticelle di chitosano</b>	183
<b>4.1. Scopo del lavoro</b>	183
<b>4.2. Parte sperimentale</b>	184
<i>4.2.1. Materiali</i>	184
<i>4.2.2. Preparazione delle nanoparticelle di chitosano/TPP</i>	184
<i>4.2.3. Trattamento agli ultrasuoni</i>	185
<i>4.2.4. Determinazione del diametro medio e della distribuzione dimensionale delle nanoparticelle</i>	186
<i>4.2.5. Separazione delle nanoparticelle, Resa % e Water Loading %</i>	187
<i>4.2.6. Analisi FTIR</i>	187
<i>4.2.7. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)</i>	188
<i>4.2.8. Analisi HPLC e associazione % dell'insulina alle nanoparticelle di chitosano/TPP</i>	188
<b>4.3. Risultati e discussione</b>	188
<i>4.3.1. Effetto dei parametri di sonicazione applicati</i>	188
<i>4.3.2. Effetto della concentrazione di chitosano</i>	194
<i>4.3.3. Caratterizzazione morfologica delle nanoparticelle</i>	195
<i>4.3.4. Caratterizzazione FTIR delle nanoparticelle</i>	197
<i>4.3.5. Effetto dell'applicazione degli ultrasuoni per sonicazione della sola dispersione di chitosano</i>	199
<i>4.3.6. Effetto del peso molecolare del chitosano sul diametro medio, sul potenziale zeta, sull'IP, e sulla resa % di nanoparticelle</i>	201

---

<i>4.3.7. Ridispersione delle nanoparticelle separate per centrifugazione</i>	203
<i>4.3.8. Prove di caricamento dell'insulina</i>	208
<i>4.3.9. Caratterizzazione FTIR delle nanoparticelle caricate con insulina</i>	210
<b><i>4.4. Conclusioni e propositi futuri</i></b>	212
<b><i>Ringraziamenti</i></b>	214
<b><i>Bibliografia</i></b>	215

---

---

---

## 1. Introduzione

### 1.1. Nanoscienza, Nanotecnologia e Nanomedicina

*“Le nanoscienze costituiscono il punto di incontro di discipline diverse che vanno dalla fisica quantistica, alla chimica supramolecolare, dalla scienza dei materiali, alla biologia molecolare e rappresentano una realtà ormai affermata nel mondo della ricerca.”*

*“Le nanotecnologie, invece, puntano a sfruttare e ad applicare i metodi e le conoscenze derivanti dalle nanoscienze. Esse fanno riferimento ad un insieme di tecnologie, tecniche e processi che richiedono un approccio multidisciplinare e consentono la creazione e utilizzazione di materiali, dispositivi e sistemi con dimensioni a livello nanometrico.”*

Nonostante non esista ancora una definizione universalmente accettata per descrivere le ‘nanoscienze’ e le ‘nanotecnologie’, ve ne sono diverse simili tra loro, tra cui queste di sopra riportate, riferite nel 2004 dalla Royal Society e Royal Academy of Engineering (UK).

In sintesi, con nanotecnologie si intende la capacità di *osservare, misurare e manipolare la materia su scala atomica e molecolare*.

Il mondo delle nanotecnologie è quello compreso tra 1 e 100 nanometri e sono “nanoprodotti” quei materiali o dispositivi nei quali vi è almeno un componente funzionale con dimensioni inferiori a 100 nm.

Le prospettive rivoluzionarie associate alla nanotecnologia derivano dal fatto che, a questi livelli di dimensioni, comportamenti e caratteristiche della materia cambiano drasticamente e le nanotecnologie rappresentano un modo radicalmente nuovo di produrre per ottenere materiali, strutture e dispositivi con proprietà e funzionalità grandemente migliorate o del tutto nuove.

Per operare a livello nanometrico si possono seguire due strade. Una fa riferimento all’approccio cosiddetto **“top down”**, che significa ridurre con metodi fisici le dimensioni delle strutture verso livelli nano. L’altra via è invece quella cosiddetta **“bottom up”**, che sta ad indicare l’approccio nel quale, partendo da piccoli componenti, normalmente molecole o aggregati di molecole, si cerca di controllarne/indirizzarne l’assemblaggio utilizzandoli come “building

---

blocks” per realizzare nanostrutture, sia di tipo inorganico che organico/biologico.

Il carattere abilitante delle nanotecnologie fa sì che esse trovino applicazione praticamente in tutti i settori produttivi entrando a far parte di un mercato di dimensioni veramente vaste. Secondo uno studio di *Lux Research* del 2004, quelli per i quali si prevede il maggior volume di mercato da qui al 2015 sono, nell’ordine:

- Materiali
- Elettronica
- Farmaceutica
- Processi chimici
- Aerospazio
- Cura della salute
- Utensili
- Processi sostenibili

L’impatto delle nanotecnologie nel campo della farmaceutica, e più in generale della cura della salute, oltre che dal punto di vista economico sarà rilevante anche dal punto di vista dell’impatto sociale.

Si può quindi parlare di *nanomedicina*, termine con il quale si intendono tutti gli interventi innovativi nel settore sanitario che sfruttano l’applicazione delle nanotecnologie.<sup>1</sup> Inoltre, la “nanomedicina” promette, infatti, di rivoluzionare letteralmente la pratica medica mettendo a disposizione nuovi e più efficaci strumenti diagnostici e sistemi di cura innovativi, che possono favorire l’introduzione di terapie personalizzate.

La nanomedicina gioca un ruolo fondamentale in diversi campi tra cui la *medicina preventiva, la diagnosi, la terapia e il follow-up*.

Nella *medicina preventiva* e nella diagnostica precoce la nanotecnologia può apportare importanti novità tra cui, per esempio, la generazione di biomarkers più sensibili, capaci di rendere i test diagnostici molto più precisi e semplici da effettuare; in questo modo sarebbe possibile non solo il rilevamento precoce delle malattie, ma anche l’accertamento della predisposizione individuale alle stesse. Altro esempio può essere rappresentato dalla mammografia ai raggi X per

---



---

la diagnosi precoce del cancro al seno, attraverso i nuovi agenti di contrasto nanostrutturati potrà essere possibile ottenere un direccionamento mirato tale da poter rilevare il tumore in uno stadio ancora precedente a quanto possa essere fatto al giorno d'oggi, permettendo un sistema di prevenzione più approfondito.

Per quanto concerne la *diagnostica*, già in parte introdotta nell'illustrazione della medicina preventiva, i principali strumenti nanotecnologici oggetto di studio attuali sono rappresentati dai sistemi di imaging miniaturizzati, con i quali potrà essere possibile l'esecuzione di studi diagnostici non esclusivamente in centri di ricerca ma anche in altre sedi, permettendo un notevole risparmio economico. Inoltre, attraverso questi sistemi si potrebbe effettuare il monitoraggio delle cellule malate nel loro stesso microambiente, in modo da poter impostare un trattamento personalizzato per ogni singolo paziente.

Intervento altrettanto importante è quello della nanomedicina nel *campo terapeutico*, che non è limitato solo al drug delivery, ma anche alla chirurgia e alla radioterapia. Il processo di miniaturizzazione di svariati tipi di dispositivi permetterà, per esempio, di ridurre al minimo le procedure invasive negli interventi di chirurgia. Inoltre, tra i principali interventi innovativi vi è lo sviluppo di drug delivery systems in grado di veicolare farmaci o di applicare una determinata terapia solo a livello delle cellule malate, aumentando l'efficacia dell'intervento e riducendo gli effetti collaterali indesiderati. Peraltro la formulazione di *drug delivery* potrà essere utilizzata come vettore di speciali molecole capaci di indurre la rigenerazione di tessuti e organi danneggiati a livello endogeno, cioè dall'interno. Si parla quindi di *medicina rigenerativa*. Particolarmente in quest'ultima applicazione sarà necessario trovare biomateriali intelligenti e molecole bioattive che agiscano a livello cellulare (riconoscimento molecolare, bioadesione, stimolazione dei processi di crescita e differenziazione cellulare).<sup>5</sup>

In ultimo parliamo di *follow-up*, termine con il quale si intende il monitoraggio del paziente attraverso visite cliniche o esami strumentali nel periodo seguente a un determinato trattamento terapeutico, al fine di verificare l'evoluzione della malattia e le condizioni cliniche del paziente.

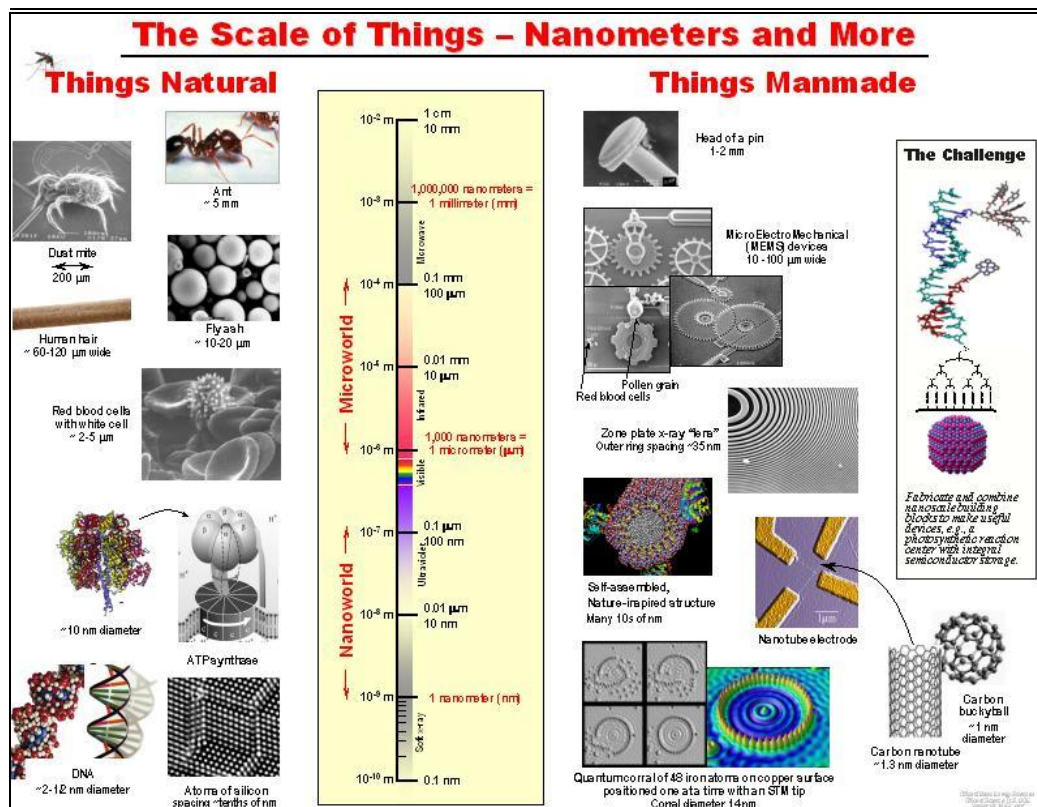
---

La nanomedicina può apportare importanti innovazioni anche in questo campo in quanto la generazione di dispositivi diagnostici di più semplice uso e poco invasivi, il monitoraggio di specifici biomarkers e l'imaging molecolare permetterebbero un controllo regolare e costante delle condizioni del paziente ed il rapido riconoscimento di eventuali segnali di recidiva. Inoltre, sistemi a rilascio controllato (tra cui forme farmaceutiche nanostrutturate) potrebbero garantire il rilascio prolungato nel tempo di farmaci necessari alla terapia di mantenimento o di riabilitazione del paziente.

Attraverso questa panoramica è possibile rendersi conto dell'importante ruolo che il campo farmaceutico gioca nell'ambito della nanomedicina, in particolare un apporto fondamentale è dato dall'innovazione nei Drug delivery systems.

I sistemi per la diagnosi, per il targeted delivery (rilascio sito specifico dei farmaci) e la medicina rigenerativa sono in grado di mettere in atto più processi contemporaneamente offrendo la possibilità di abbinare la funzione diagnostica a quella terapeutica o viceversa, dando luogo in questo modo a un nuovo paradigma terapeutico a cui si è dato il nome di *teranostica*.<sup>2</sup>

La possibilità di abbinare l'applicazione diagnostica a quella terapeutica può essere in grado di fornire protocolli terapeutici specifici per i pazienti e quindi prognosi migliori. Lo sviluppo e l'applicazione dei sistemi nanostrutturati nel campo dell'Imaging è avvenuto in maniera indipendente rispetto a quello realizzatosi nell'area del Drug Delivery, solo in seguito alla loro conoscenza nei due diversi ambiti si è pensato che le due applicazioni si potessero abbinare, creando un'unica piattaforma, basata sullo sfruttamento di sistemi nanoparticellari, chiamata appunto 'teranostica'.<sup>3</sup>



**Fig. 1** Rappresentazione grafica di entità di origine naturale o prodotte dall'uomo di dimensioni nell'ordine dei nanometri (nanomondo) e nell'ordine dei micrometri (micromondo). Scala metrica indicativa del range 0,1 nm – 1 cm.

## 1.2. Drug delivery systems: obiettivi e prospettive

Tra i delivery systems nanostrutturati innovativi annoveriamo i liposomi, i sistemi micellari e le nanoemulsioni, i cristalli liquidi, gli anticorpi e i loro coniugati, le proteine, i polimeri coniugati e bio-coniugati, le nanoparticelle e le nanocapsule biodegradabili e così via.

Nel campo dei delivery systems la maggiore attenzione è dedicata allo sviluppo del *targeting*, ovvero di una somministrazione mirata attraverso la quale il farmaco raggiunge ed è attivo solo in specifiche aree del corpo o tessuti, come per esempio il tessuto tumorale.

I vantaggi della nanotecnologia nella veicolazione dei farmaci verso i siti specifici colpiti dalla malattia sono numerosi; uno di questi è rappresentato dal fatto che i carrier nanostrutturati riescono ad attraversare i vasi sanguigni che irrorano il tumore, in quanto, essendo vasi originati da un fenomeno di angiogenesi incompleta, presentano ampie fenestrature e quindi una permeabilità

---

molto più elevata rispetto ai vasi normali, permettendo in questo modo la realizzazione di un targeting di tipo *passivo*.

Inoltre, nei tessuti tumorali, all'aumentata permeabilità vascolare vi è di solito abbinato un drenaggio linfatico alterato (effetto EPR: enhanced permeability and retention), il quale comporta una maggiore ritenzione dei nanosistemi nei tessuti.

Un altro esempio di targeting passivo cui i nanosistemi possono andare incontro è rappresentato dalla tendenza al loro accumulo nelle cellule del sistema del reticolo endoteliale (RES), le quali trovandosi localizzate soprattutto a livello di determinati organi come fegato e milza, determinano un'elevato accumulo delle nanostrutture a livello di taluni organi.

Nel caso in cui il carrier non voglia essere direzionato a livello del RES (*per targeting passivo*) è necessario che venga modificato al fine di promuoverne una più lunga permanenza in circolo e consentirne l'arrivo nel sito di interesse.<sup>4</sup>

Un altro vantaggio presentato dai nanocarrier è quello di riuscire ad oltrepassare la barriera ematoencefalica (BEE), soprattutto se abbinati a particolari molecole direttive; la BEE, infatti, comportandosi come organo di protezione molto efficiente rappresenta un limite importante per la distribuzione dei farmaci al sistema nervoso centrale e difficilmente può essere superata attraverso dei carrier di dimensioni superiori ai 100 nm.

Il targeting attivo, mediante il legame di un gruppo direttivo al nanocarrier, e il targeting fisico, mediante la creazione di un nanocarrier sensibile a variazioni di pH o all'applicazione di un campo magnetico esterno, possono essere anch'essi sfruttati al fine di ottenere un direzionamento sito-specifico.

Nel mio percorso di Dottorato mi sono concentrata prevalentemente su due linee di ricerca, una relativa a carrier vescicolari magnetici, anche denominati magnetoliposomi, e l'altra relativa a nanoparticelle di chitosano.

Facendo un breve riferimento a quanto riportato nella precedente parte introduttiva, sul concetto di nanotecnologia e sugli approcci applicativi per operare a livello nanometrico, è interessante osservare come tali basi concettuali coincidano alla reale modalità di lavoro da cui nascono entrambi i tipi di nanocarrier formulati.

---

---

Entrando nello specifico, è abbastanza chiaro come, sia nel caso dei magnetoliposomi che nel caso delle nanoparticelle di chitosano, si parta da molecole o aggregati di molecole da cui, attraverso specifiche metodiche di preparazione, vengono ottenute delle strutture più complesse, mettendo in atto il cosiddetto approccio del *bottom up*; al contempo, laddove le strutture complesse ottenute non rientrassero nella scala nanometrica si prosegue con l'applicazione di metodi fisici che riportino le dimensioni delle strutture verso livelli nano, mettendo in atto il cosiddetto meccanismo del *top down*.

I magnetoliposomi e le nanoparticelle polimeriche occupano, ciascuno nel proprio ambito di applicazione, un ruolo importante nel settore della ricerca tecnologico-farmaceutica; al fine metterne in luce lo stato dell'arte attuale, le principali proprietà e caratteristiche, è di seguito riportata una breve trattazione su entrambi.

### **1.3. I magnetoliposomi**

I magnetoliposomi nascono dall'idea di abbinare le caratteristiche esclusive possedute dai colloidi magnetizzabili con quelle dei liposomi, comunemente conosciuti per la loro biocompatibilità e versatilità. Le principali applicazioni biomediche dei magnetoliposomi sono l'Imaging a Risonanza Magnetica (MRI), il trattamento del cancro attraverso l'ipertermia e il rilascio sito-specifico di farmaci.

Con il termine di magnetoliposomi si fa comunemente riferimento a tutti i sistemi derivanti dall'utilizzo accoppiato di fosfolipidi e nanoparticelle ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  maghemite –  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetite) o sostanze aventi proprietà magnetiche ( $\text{Gd}^{3+}$  Gadolinium). Quando il materiale magnetico coinvolto è rappresentato da nanoparticelle di ossido di ferro in realtà la denominazione di *magnetoliposomi* risulta essere molto generica e limitante, in quanto fa subito pensare ad un liposoma che carica sulla sua struttura delle nanoparticelle magnetiche.

In realtà questa valutazione iniziale sottovaluta il fatto che le nanoparticelle magnetiche rappresentino una vera e propria entità, non deformabile, dotata di specifiche caratteristiche chimico-fisiche e con un diametro tra gli 8 e i 10 nm. Per piccole che siano quindi le nanoparticelle magnetiche di ossido di ferro,

---

---

anche denominate Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION), non sono assolutamente degli elementi trascurabili o paragonabili ai farmaci comunemente caricati nelle strutture vescicolari.

Questa breve parentesi iniziale, relativa alla denominazione dei carrier magnetici, non vuole andare a demolire la stessa per usarne un'altra, ma vuole semplicemente offrire la possibilità a chi si accinge a leggere il lavoro di ricerca svolto, o a chi vuole farne buon uso per una ricerca futura, di potersi avvicinare all'argomento in maniera del tutto libera da schemi mentali che possono scaturire dal pensiero di avere a che fare con dei comuni liposomi! A questo riguardo, pur non volendo sostituire la terminologia comunemente usata, in alcune parti del lavoro li definiremo anche come *nanocolloidi magnetici ibridi*.

Le prospettive offerte dai magnetoliposomi sono essenzialmente due e sono l'una o l'altra predominante a seconda del fine applicativo. Una consiste nel fatto che, attraverso la presenza delle nanoparticelle magnetiche, un'ipotetica struttura vescicolare (per esempio veicolante un farmaco antitumorale) può essere trasportata per targeting fisico nel sito di interesse; l'altra consiste nel fatto che attraverso la presenza dei fosfolipidi le nanoparticelle magnetiche vengono stabilizzate in modo tale da consentirne l'uso a contatto con i fluidi biologici (per esempio nell'applicazione della magnetite come agente di contrasto nell'imaging a risonanza magnetica).

E' facile comprendere quindi come nel primo caso è il liposoma che sfrutta la nanoparticella magnetica per raggiungere il suo obiettivo, mentre nel secondo caso è la nanoparticella magnetica che sfrutta i fosfolipidi per raggiungere il suo scopo finale.

Ad ogni modo, in letteratura i magnetoliposomi vengono suddivisi in due classi principali, i '*classical magnetoliposomes*' e gli '*extruded magnetoliposomes*'.

Questa classificazione si basa prevalentemente su una diversità strutturale. I *classical magnetoliposomes*, preparati per la prima volta da De Cupper et al. (1987)<sup>6</sup>, sono caratterizzati da una singola nanoparticella magnetica (magnetite,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) di diametro intorno ai 14 nm sulla cui superficie vengono a disporsi i fosfolipidi, dando luogo alla formazione di un singolo bilayer. Tale conformazione comporta il fatto che i magnetoliposomi classici siano quindi

---

---

privi di core acquoso e non presentino già in partenza la struttura multilamellare, solita dei liposomi nella fase precedente ai trattamenti di sonicazione o estrusione applicati. Sono chiari quindi i vantaggi e gli svantaggi posseduti da una simile struttura colloidale, che impedisce ovviamente il caricamento di farmaci idrofili e limita quello dei farmaci lipofili (per la presenza sempre ed esclusivamente di un singolo bilayer), ma al contempo garantisce un'efficienza di incapsulazione della magnetite pari al 100% e quindi un potenziale grado di magnetizzazione elevato se sottoposto ad un campo magnetico.

L'altra categoria di magnetoliposomi, anche denominati *extruded magnetoliposomes*, consiste invece in liposomi unilamellari contenenti nel core acquoso un numero variabile di nanoparticelle magnetiche di dimensioni intorno ai 7-10 nm, quindi di diametro inferiore rispetto a quelle utilizzate da De Cupyer. Questo tipo di struttura comporta il vantaggio di poter caricare anche farmaci idrofili, grazie alla presenza del core acquoso, e al contempo l'ottenimento di buone capacità magnetiche. L'unilamellarità del carrier vescicolare in questo caso non è legata ad una sua spontanea determinazione, come nel caso dei liposomi di De Cupyer, ma in generale all'applicazione del processo di estrusione alla formulazione di magnetoliposomi (da cui la loro stessa denominazione) ottenuti mediante le classiche procedure di preparazione, quali la thin layer evaporation (TLE) o la reverse phase evaporation (REV).

La grande diversità tra queste due classi consiste quindi, oltre che nelle differenze morfologico-strutturali dei carrier ottenuti, nel tipo di metodica utilizzata per la loro preparazione. De Cupyer, infatti, ottiene i *classical magnetoliposomes* mettendo a contatto una dispersione di vescicole pre-formate con un ferrofluido acquoso, ovvero una dispersione di nanoparticelle magnetiche, e sottopone il tutto a processo di dialisi. Il ferrofluido utilizzato in questo caso è determinato da nanoparticelle di magnetite preparate attraverso la metodica di Reimers and Khalafalla (1976); queste, nell'ultimo step di preparazione, vengono generalmente trattate con acido oleico, il quale viene ad essere adsorbito sulla loro superficie, rendendole prettamente di natura idrofobica e quindi affini ai solventi apolari, nei quali infatti si trovano facilmente disperdibili.

---



---

In realtà, le nanoparticelle utilizzate da De Cupper, invece che essere trattate con acido oleico (C18) vengono trattate con acido laurico (C11), il quale pur essendo dotato anch'esso di una catena idrofobica relativamente lunga, una volta adsorbito sulla superficie della nanoparticella ne consente la ridispersione in acqua, permettendo la generazione del ferrofluido acquoso prima citato. Nel suddetto lavoro, però, non si fa esplicito riferimento al tipo di interazione esistente tra l'acido laurico e le nanoparticelle magnetiche, in quanto pur parlando di adsorbimento non viene specificato se di tipo fisico o chimico. La fase di contatto tra il ferrofluido e le vescicole preformate durante il processo di dialisi comporta la perdita da parte delle nanoparticelle magnetiche delle molecole di acido laurico e la loro seguente sostituzione con i fosfolipidi, i quali formano dapprima un monolayer e di seguito la tipica struttura a doppio strato. In tutti i lavori a seguire, la tecnica di preparazione dei *classical magnetoliposomes* ha sempre coinvolto lo stesso tipo di nanoparticelle, ovvero magnetite circondata da acido laurico.

Nel caso dell'altra classe di magnetoliposomi le metodiche di preparazione utilizzate sono quelle normalmente applicate per i liposomi non magnetici, ovvero la TLE e la REV. Non altrettanto univoca invece è la natura della magnetite coinvolta; infatti, in uno dei primi lavori sui magnetoliposomi, pubblicato nel 1986 da Kiwada et al.<sup>7</sup>, in cui la preparazione dei magnetoliposomi procede appunto attraverso la TLE, le nanoparticelle di magnetite vengono aggiunte nella miscela metanolo/cloroformio, utilizzata per la dispersione dei fosfolipidi, non specificando né il tipo di stabilizzazione delle stesse, né il tipo di posizionamento nella struttura vescicolare ottenuta. L'aggiunta della magnetite nella miscela metanolo/cloroformio conferisce loro un possibile carattere apolare, di cui però non possiamo averne un concreto riscontro o definirne il grado.

A seguire vi sono numerosi lavori sui magnetoliposomi in cui la magnetite utilizzata è chiaramente di natura idrofilica, in quanto dispersa in mezzo acquoso e solitamente stabilizzata con citrato di sodio, anch'esso probabilmente adsorbito sulla superficie nanoparticellare. Il ferrofluido acquoso in questi casi viene sempre aggiunto nella fase di idratazione del film sottile dando luogo a dei

---



---

magnetoliposomi con un core acquoso contenente nanoparticelle magnetiche,<sup>8,</sup>  
<sup>11, 12</sup> configurazione in alcuni casi anche dimostrata attraverso delle esaustive  
foto TEM.<sup>9, 10</sup>

Continuando nella ricerca bibliografica è possibile incontrare lavori su magnetoliposomi preparati a partire da magnetite o maghemite stabilizzate con acido glutammico<sup>13</sup>, acido tartarico<sup>14</sup> o tetrametilammonio<sup>15</sup>, tutte molecole di natura idrofilica ma ben differenti per caratteristiche e proprietà. Al contrario è presente in letteratura un solo lavoro riguardante la preparazione di magnetoliposomi a partire da magnetite di natura idrofobica, stabilizzata con acido oleico e quindi per questo aggiunta al cloroformio utilizzato per la dispersione dei fosfolipidi.<sup>16</sup> C'è da aggiungere inoltre che quest'unico lavoro presente non ha un'impronta tecnologico-farmaceutica ma piuttosto chimico-fisica.

L'ampia varietà di tipi di magnetite coinvolte in questa seconda categoria di magnetoliposomi, l'assenza in alcuni lavori di indagini morfologiche che comprovino l'effettivo posizionamento delle nanoparticelle e l'assenza di indagini che vadano a indagare sulle possibili interazioni tra fosfolipidi e magnetite a seconda della stabilizzazione di quest'ultima, amplificano le variabili che possono entrare in gioco nell'approccio sperimentale a questo tipo di formulazioni. Inoltre, nonostante vi siano numerosi studi in vitro<sup>8, 9, 11, 13, 14</sup> e in vivo<sup>9, 12, 14, 17, 18</sup> inerenti l'applicazione dei magnetoliposomi, non risultano altrettanto esaustivi gli studi dedicati alle fasi formulative e di caratterizzazione degli stessi<sup>6, 15</sup>.

Per tutti questi motivi si è deciso di dedicare molta attenzione all'analisi dei carrier magnetici creati a partire da diversi tipi di magnetite (idrofilica e idrofobica) in modo da metterne in evidenza le differenze (morfologiche, dimensionali, di carica superficiale, di stabilità nel tempo); inoltre, si è eseguito uno studio su formulazioni preparate a concentrazioni crescenti di magnetite in modo da mettere in evidenza il grado di associazione tra il carrier e le nanoparticelle magnetiche. Altro importante obiettivo è stato quello di riuscire a dimostrare la buona versatilità della magnetite idrofobica per la preparazione di carrier magnetici, data l'assenza ad oggi di studi formulativi e di

---

---

caratterizzazione su questo tipo di nanocarrier. In particolare, sono stati coinvolti due tipi di magnetite idrofobica, ottenute attraverso due metodiche di sintesi differenti, caratterizzate da un differente rapporto percentuale magnetite:acido oleico. Vedremo quindi come, pur parlando in entrambi i casi di magnetoliposomi ottenuti a partire, genericamente, da magnetite idrofobica, i risultati ottenuti nei due casi siano ben diversi a parità di metodica (TLE) e procedura formulativa. In ultimo, si sono svolti gli studi di citotossicità su uno dei due tipi di magnetite idrofobica utilizzati e sui relativi magnetoliposomi. In questa sessione di lavoro le strutture vescicolari magnetiche sono state preparate in modo tale da renderle maggiormente stabili nel sistema biologico; in particolare, queste sono state formulate utilizzando fosfolipidi legati covalentemente a molecole di polietilenglicole, in modo da formare un rivestimento superficiale capace di impedire fisicamente l'interazione con le proteine plasmatiche e limitare il processo di opsonizzazione.

L'obiettivo cui si è mirato durante lo sviluppo del progetto di ricerca è stato quello di preparare un carrier magnetico capace di veicolare un farmaco verso un determinato sito attraverso lo sfruttamento di un campo magnetico esterno (targeting fisico); ciò non esclude però la possibilità di scegliere e perfezionare i carrier magnetici preparati anche come possibili strumenti per l'applicazione dell'ipertermia o nel campo dell'imaging a risonanza magnetica.

#### ***1.4. Le nanoparticelle di chitosano***

Il chitosano è un polimero policationico biodegradabile dotato di una bassa immunogenicità. Ad oggi gli studi svolti sulla formulazione di carrier e delivery systems a base di chitosano sono numerosi, in particolare essi riguardano la veicolazione di macrosoluti ad attività terapeutica come geni e molecole proteiche; tale specifica propensione è giustificata prevalentemente dalla carica positiva posseduta dal chitosano che va ad interagire con molecole caricate negativamente, come DNA e proteine, formando dei complessi.<sup>19, 20</sup>

Le nanoparticelle di chitosano sono degli ottimi promotori di assorbimento sia per la somministrazione di farmaci per via orale che nasale,<sup>21</sup> ma trovano

---

larga applicazione anche nel rilascio sito specifico al colon, nel rilascio di vaccini e nelle terapie antitumorali.<sup>22</sup>

Tra le principali applicazioni per la preparazione di nanoparticelle di chitosano vi sono il metodo dell'emulsione acqua in olio e lo sfruttamento di cross linking di tipo chimico; l'elevata ripetibilità di tale metodica e la stabilità delle nanoparticelle ottenute nonostante tutto non bastano a bilanciare gli effetti negativi conseguenti a questo tipo di approccio. In particolare, l'utilizzo di agenti cross-linkanti, come per esempio la glutaraldeide, influisce negativamente sulla vitalità cellulare e sull'integrità dei farmaci macromolecolari coinvolti.

Tali difficoltà hanno portato alla conclusione che fosse comunque necessario lo sviluppo di metodiche di preparazione meno aggressive e che non coinvolgessero l'uso di sostanze particolarmente tossiche.<sup>23</sup> Di particolare interesse risultano essere le metodiche di preparazione che determinano un cross linking di tipo ionico tra il chitosano caricato positivamente e dei polianioni.

Oltre al processo di complessazione, il chitosano, quando posto a contatto con polianioni polivalenti, va spontaneamente incontro ad un processo di gelificazione, data la formazione di cross-linkage inter e intramolecolari. Tra i polianioni più studiati e coinvolti nella preparazione di questo tipo di sistemi nanoparticellari troviamo il tripolifosfato di sodio (TPP), in quanto dotato di una limitata tossicità e di un potere gelificante elevato.

La metodica della gelificazione ionotropica che coinvolge chitosano e TPP risulta essere ottimale sotto diversi aspetti, tra cui le blande condizioni richieste per lo svolgimento della metodica, l'omogeneità del sistema nanoparticellare ottenuto, la sua carica superficiale positiva e una grande capacità per l'associazione di peptidi, proteine, oligonucleotidi e plasmidi.<sup>24</sup>

Al fine di migliorare le caratteristiche fisiche delle nanoparticelle ottenute uno dei metodi più comunemente applicati è il processo di sonicazione. In particolare, l'obiettivo cui si mira attraverso il trattamento agli ultrasuoni è quello di ridurre le dimensioni medie del sistema disperso e di rendere più omogenea la popolazione nanoparticellare.<sup>25</sup> A tal riguardo i sistemi nanoparticellari di chitosano/TPP sono stati già oggetto di studio.<sup>26,27</sup>

---

Entrando nel merito degli effetti indotti dal processo di sonicazione è necessario descrivere il fenomeno della “cavitazione”, il quale consiste nella formazione, nello sviluppo e nel collasso implosivo di bolle in un liquido. Ciò avviene in conseguenza del fatto che le onde ultrasoniche propagandosi nel liquido causano un abbassamento locale di pressione ad un valore inferiore alla tensione di vapore del liquido stesso, che subisce così un cambiamento di fase a gas, formando *cavità* contenenti vapore. La dinamica di sviluppo e del collasso della cavità della bolla dipendono strettamente dalle caratteristiche dell’ambiente circostante. Quando le bolle di cavitazione implodono in liquidi irradiati la loro compressione è così rapida che una piccola quantità di calore può sfuggire dalla cavità durante il suo collasso. Il liquido circostante, d'altra parte, è ancora freddo ed estinguerà prontamente la cavità riscaldata.

In questo modo viene prodotto un punto caldo (*hot spot*), di breve durata, localizzato in un liquido freddo, il quale possiede una temperatura approssimativa di 5000°C, una pressione di circa 1000 atmosfere, un tempo di vita inferiore ad un microsecondo e la sua velocità di riscaldamento e raffreddamento supera i 10 miliardi di gradi Celsius/sec.

Sono quindi molteplici le modalità attraverso cui gli ultrasuoni influiscono sul sistema sottoposto al trattamento, tra queste troviamo l’effetto diretto delle onde ultrasoniche che si propagano nel liquido, l’intensità del fenomeno di cavitazione indotto (formazione di poche/molte bolle), l’implosione delle bolle di cavitazione, fino al calore derivante dall’implosione delle bolle stesse (molto importanti diventano quindi anche alcuni dettagli quali: il tipo di sonda usata, le dimensioni e la forma del recipiente nel quale la miscela viene sottoposta a sonicazione, il volume del sistema disperso sonicato ecc.).

Data quindi la possibilità, attraverso gli ultrasuoni, di modulare le caratteristiche fisiche delle nanoparticelle, si è ritenuto interessante approfondire questo aspetto, andando a confermare eventualmente quanto già riportato in letteratura, ma al contempo mettendo in luce problematiche ed eventuali aspetti innovativi capaci di migliorare questo tipo di approccio sperimentale.

Dagli studi eseguiti infatti sarà facile rendersi conto di come il monitoraggio degli effetti della sonicazione possa mettere in evidenza la possibilità di

---

---

preparare dei sistemi particellari di dimensioni differenti, entro un range abbastanza ampio che vada dai 350 fino ai 50 nm circa.

Lo studio ha quindi permesso di abbinare a dei valori medi dimensionali il trattamento di sonicazione di riferimento, mettendo in luce la possibilità di decidere, in base al sito target che si vuole raggiungere con il carrier (es. sistema nervoso centrale, superamento della BEE: dimensioni carrier richieste tra i 50 e gli 80 nm; circolo sistemico: dimensioni carrier richieste < 200 nm e così via), quale trattamento ultrasonico applicare. Il carrier nanoparticellare acquisisce in questo modo un'elevata versatilità trovando un possibile impiego in svariate applicazioni tecnologico-farmaceutiche.

Inoltre, lo studio è stato articolato in modo da mettere in evidenza gli effetti della sonicazione su sistemi creati a partire da diversi tipi di chitosano o su formulazioni a concentrazioni di chitosano crescenti, in modo da mettere in gioco numerose variabili.

L'applicazione pratica della metodica di sonicazione sui sistemi nanoparticellari di chitosano/TPP ha permesso di valutare il proporzionale sviluppo di calore all'aumentare dell'intensità di sonicazione; quindi, benché lo studio abbia portato ad ottenere dei buoni risultati dal punto di vista tecnologico (in termini di media dimensionale e di polidispersità) ha anche fatto emergere dei punti critici, tra cui in particolare l'elevato rischio di stress e di alterazione per l'eventuale farmaco caricato nel carrier nanoparticellare.

Tale problematica può diventare seria e quasi ostacolante nel caso della preparazione di sistemi carrier destinati alla veicolazione di molecole proteiche (generalmente termo e meccanosensibili), come è il caso delle nanoparticelle di chitosano. A tal fine è stato studiato un possibile approccio alternativo che permetterebbe comunque l'applicazione degli ultrasuoni, con il raggiungimento di buone caratteristiche dimensionali e di omogeneità, ma al contempo la preservazione del farmaco.

Visti i promettenti risultati raggiunti si è inoltre cercato di mettere in evidenza l'efficienza di incapsulazione dei carrier polimerici creati nei confronti di una molecola proteica di riferimento quale l'insulina.

---

## Bibliografia

- 1 <http://www.nanotec.it/nanotecnologie.htm>
- 2 [ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanomedicine\\_bat\\_en.pdf](ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/nanotechnology/docs/nanomedicine_bat_en.pdf)
- 3 J. Xie, S. Lee, X. Chen *Nanoparticle-based theranostic agents*, Advanced Drug Delivery Reviews (2010), in press
- 4 K. Sahoo, S. Parveen, J.J. Panda, *Clinical Nanomedicine* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 3 (2007), 20– 31
- 5 <http://www.cittadeimestieri.milano.it/public/Lavorare%20con%20le%20Nanotecnologie.pdf>
- 6 De Cuyper, M.; Joniau, M.; *Magnetoliposomes: formation and structural characterization* European Biophysics Journal 15 (1988), 311-319.
- 7 H. Kiwada, J. Sato, S. Yamada, Y. Kato, *Feasibility of Magnetic Liposomes as a Targeting Device for Drugs* Chem. Pharm. Bull. 34 (10) (1986), 4253-4258.
- 8 M.S. Martina, V. Nicolas, C. Wilhelm, C. Menager, G. Barratt, S. Lesieur, *The in vitro kinetics of the interactions between PEG-ylated magnetic-fluid-loaded liposomes and macrophages* Biomaterials 28 (2007), 4143-4153.
- 9 M. S. Martina, J.P. Fortin, C. Mènager, O. Clément, G. Barratt, C. G. Madelmont, F. Gazeau, V. Cabuil, S. Lesieur, *Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging* J. Am. Chem. Soc. 127 (2005), 10677-10682.
- 10 S. J.H. Soenen, A. R. Brisson, M. De Cuyper, *Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: The magnetoliposome model* Biomaterials 30 (2009) 3691–3701.
- 11 M. S. Martina, C. Wilhelm, S. Lesieur, *The effect of magnetic targeting on the uptake of magnetic-fluid-loaded liposomes by human prostatic adenocarcinoma cells* Biomaterials 29 (2008) 4137–4145.
- 12 J.P. Fortin-Ripoche, M.S. Martina, F. Gazeau, C. Mènager, C. Wilhelm, J. C. Bacri, S. Lesieur, O. Clément, *Magnetic Targeting of Magnetoliposomes to Solid Tumors with MR Imaging Monitoring in Mice: Feasibility* Radiology: volume 239: Number 2 - (May 2006).
- 13 L. Zhu, Z. Huo, L. Wang, X. Tong, Y. Xiao, K. Ni, *Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive Magnetoliposomes* International Journal of Pharmaceutics 370 (2009) 136–143.
- 14 X. Zheng, J. Lu, L. Deng, Y. Xiong, J. Chen, *Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery* International Journal of Pharmaceutics 366 (2009) 211-217.

- 
- 15** R. Sabate, R. Barnadas-Rodriguez, J. Callejas-Fernandez, R. Hidalgo-Alvarez, J. Estelrich, *Preparation and characterization of extruded magnetoliposomes* International Journal of Pharmaceutics 347 (2008), 156–162.
- 16** M. Gonzales, K. M. Krishnan, *Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystals cores for hyperthermia*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials 293 (2005), 265–270.
- 17** V. Plassat, M.S. Martina, G. Barratt, C. M'enager, S. Lesieur *Sterically stabilized superparamagnetic liposomes for MR imaging and cancer therapy: Pharmacokinetics and biodistribution* International Journal of Pharmaceutics 344 (2007) 118–127.
- 18** C. Rivière, M.S. Martina, Y. Tomita, C. Wilhelm, A. Tran Dinh, C. M'enager, E. Pinard, S. Lesieur, F. Gazeau, J. Seylaz, *Magnetic Targeting of Nanometric Magnetic Fluid-loaded Liposomes to Specific Brain Intravascular Areas: A Dynamic Imaging Study in Mice* Radiology: Volume 244: Number 2— (August 2007).
- 19** K.A. Janes, P. Calvo, M.J. Alonso, *Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules*, Adv. Drug Deliv. Rev. 47 (2001) 83–97.
- 20** S.C. W. Richardson, H. V.J. Kolbe, R. Duncan, *Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA*, Int. J. Pharm. 178 (1999) 231–243.
- 21** I. M. Van der Lubben, J. C. Verhoef, G. Borchard, H. E. Junginger, *Chitosan for mucosal vaccination* Advanced Drug Delivery Reviews 52 (2001), 139–144.
- 22** S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, T. M. Aminabhavi, *Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery* Journal of Controlled Release 100 (2004), 5–28.
- 23** Y. Ohya, M. Shiratanhi, H. Kobayashi, T. Ouchi, *Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity*, Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry, 1520-5738, Volume 31, Issue 5, (1994), Pages 629 – 642.
- 24** X.Z. Shu, K.J. Zhu, *A new approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled drug delivery* Int. J. Pharm. 201 (2000) 51–58.
- 25** E.S.K. Tang, M. Huang, L.Y. Lim *Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles* International Journal of Pharmaceutics 265 (2003) 103–114.
- 26** M. L. Tsai, S. W. Bai, R. H. Chen, *Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan–sodium tripolyphosphate nanoparticle* Carbohydrate Polymers 71 (2008) 448–457.
- 27** F. Grieser, M. Ashokkumar, J.Z. Sostaric, *Sonochemistry and sonoluminescence in colloidal systems*, In: Crum, L.A., Mason, T.J., Reisse J.L., Suslick, K.S. (Eds.), Sonochemistry and Sonoluminescence NATO ASI Series. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, (1999), 345–362.
-

---

---



---

## **2. I magnetoliposomi**

### **2.1. Scopo del lavoro**

L'obiettivo principale dello studio svolto sui magnetoliposomi è stato quello di caratterizzare dal punto di vista chimico-fisico i carrier magnetici ottenuti a partire da diversi tipi di magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). In particolare, sono stati utilizzati tre tipi di nanoparticelle magnetiche a base di ossido di ferro, un tipo di natura idrofilica e due di natura idrofobica. Un'attenta analisi morfologica al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) ha permesso di mettere in evidenza il posizionamento dei tre diversi tipi di nanoparticelle magnetiche nelle relative strutture vescicolari ibride derivanti. Inoltre, i magnetoliposomi ottenuti sono stati sottoposti a varie metodiche di purificazione al fine di separare le nanoparticelle magnetiche libere dai carrier magnetici e quindi definire il grado di associazione della magnetite alle strutture vescicolari, mediante lo svolgimento del saggio della *o*-fenantrolina (analisi quantitativa del ferro (II)). Il programma di lavoro è stato articolato nella preparazione di formulazioni a concentrazione crescente di magnetite per ciascuno dei tre tipi utilizzati; inoltre, un'attenta analisi al Dynamic Laser Light Scattering (DLS) ha permesso di determinare il diametro medio idrodinamico, l'indice di polidispersione e il potenziale zeta dei sistemi dispersi, sia immediatamente dopo preparazione che nel tempo.

### **2.2. Parte sperimentale**

#### **2.2.1. Materiali**

Per la preparazione dei liposomi e dei magnetoliposomi è stata utilizzata fosfatidilcolina di soia non idrogenata (Phospholipon90<sup>®</sup>, PM 780, P90) messa gentilmente a nostra disposizione dalla Nattermann Phospholipid GMBH (Köln, Germany). Le nanoparticelle di magnetite disperse in mezzo acquoso (HL\_SPION) e le nanoparticelle di magnetite di carattere idrofobico disperse in esano e allo stato secco (HB\_SPION $\text{C}_6\text{H}_{14}$  e HB\_SPION) sono state sintetizzate nel Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Cagliari, dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Musinu con il quale abbiamo collaborato in questo progetto di ricerca; mentre, le nanoparticelle di magnetite NANOGAP<sup>®</sup> di

---

---

carattere idrofobico, disperse in clorofornio, sono state gentilmente fornite dalla NANOGAP® SUBnmPARTICLES (Santiago de Compostela, Spagna).

Il tampone fosfato a pH 7 è stato fornito dalla Carlo Erba Reagenti; l'idrossilamina cloridrato, l'1-10 fenantrolina monoidrata, l'idrossido di sodio (pastiglie), l'acido cloridrico (37%), l'acido citrico, il sodio citrato tribasico diidrato e l'etanolo (96%) sono stati forniti dalla Sigma Aldrich (Germania). Per la preparazione delle soluzioni acquose è stata utilizzata acqua deionizzata.

### *2.2.2. Sintesi delle nanoparticelle magnetiche*

Nonostante la fase di preparazione delle nanoparticelle di magnetite non sia stata condotta nel Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico, sede principale di questo lavoro di ricerca, di seguito vengono comunque riportate le metodiche di sintesi relative a ciascun tipo di magnetite utilizzata, al fine di fornire tutte le informazioni possibili e potenzialmente utili per una migliore comprensione dell'argomento e dei risultati ottenuti. Le caratteristiche delle nanoparticelle di magnetite utilizzate, in termini di idrofilicità o idrofobicità, sono infatti di notevole importanza per la comprensione del posizionamento delle stesse e per il tipo di colloide ibrido magnetico finale che si va ad ottenere.

#### *2.2.2.1. Sintesi delle HL\_SPION*

Per la sintesi delle HL\_SPION è stata applicata la metodica di Massart<sup>1</sup>: 40 ml di una soluzione 1 M di FeCl<sub>3</sub> sono stati miscelati con 10 ml di una soluzione 2 M di FeCl<sub>2</sub> in acido cloridrico (2M), la miscela ottenuta è stata rapidamente aggiunta a 500 ml di soluzione di ammoniaca 0,7 M.

Il precipitato di colore nero ottenuto è stato poi separato dalla soluzione mediante centrifugazione. Al fine di ottenere un ferrofluido stabile a carattere acido, il precipitato è stato miscelato con 50 ml di una soluzione 2 M di acido perclorico; successivamente, il precipitato è stato nuovamente isolato per centrifugazione e peptizzato mediante l'aggiunta di 50 ml di acqua. Il ferrofluido acquoso ottenuto, con un pH intorno a 2, è risultato stabile fino ad un valore di pH pari a 5, superato il quale, invece, le nanoparticelle magnetiche iniziano ad aggregare.

---

---

Le nanoparticelle ottenute hanno presentato una carica superficiale nettamente positiva, probabilmente legata alla presenza di protoni  $H^+$  e/o  $NH_4^+$  sulla loro superficie.

#### 2.2.2.2. Sintesi delle HB\_SPION

Per la sintesi delle HB\_SPION è stata utilizzata una metodica articolata in due fasi; nella prima, sono state ottenute nanoparticelle di circa 6 nm, mentre nella seconda le nanoparticelle sono state fatte crescere da 6 a 8 nm.<sup>2,3</sup>

**1^ fase:** ottenimento HB\_SPION 6 nm – acetilacetionato di ferro (III), esadecanediolo, acido oleico, oleilamina e benziletere sono stati miscelati in un pallone a fondo tondo dotato di quattro colli e sottoposti ad agitazione magnetica. La miscela è stata riscaldata gradualmente fino a 200 °C e mantenuta a questa temperatura per 2 ore. La temperatura è stata poi aumentata rapidamente fino a 300°C e mantenuta per 1h. La miscela, di colore nero, è stata poi fatta raffreddare a temperatura ambiente. Il prodotto ottenuto è stato disperso in esano e centrifugato, per rimuovere eventuali residui, dando luogo ad un ferrofluido (se ridisperso in esano) capace di mantenere la sua stabilità per diversi mesi.

**2^ fase:** crescita delle HB\_SPION 6 nm – al fine di ottenere nanoparticelle del diametro di 8 nm, 84 mg di nanoparticelle da 6 nm sono state disperse in esano (4 ml) e aggiunte ad una miscela di  $Fe(acac)_3$ , 1,2 esadecanediolo, etere benzilico, acido oleico e oleilamina; il tutto è stato riscaldato a 100°C per 30 minuti, al fine di rimuovere l'esano, e di seguito a 200°C per 1 ora. La miscela, tenuta sotto flusso di azoto, è stata ulteriormente riscaldata fino a 300°C per 30 minuti. La miscela, di colore nero, è stata poi raffreddata a temperatura ambiente e il prodotto ottenuto è stato disperso in esano e centrifugato per rimuovere eventuali residui. Le nanoparticelle di magnetite ottenute, sottoforma di pasta semisolida, sono state, nel caso degli MLP\_HB **fase 1**, ridisperse in esano ( $HB\_SPION_{C_6H_{14}}$ ) e quindi utilizzate sottoforma di ferrofluido, mentre, nel caso degli MLP\_HB **fase 2**, lasciate allo stato secco (HB\_SPION). Le nanoparticelle ottenute hanno un rapporto percentuale acido oleico: $Fe_3O_4$  di 50:50.

---

---

### 2.2.2.3. Sintesi delle nanoparticelle Nanogap<sup>®</sup>

Le nanoparticelle di magnetite sono state preparate attraverso la metodica della coprecipitazione in soluzione acquosa, seguendo anche in questo caso il Metodo Massart<sup>1</sup>. Tuttavia, in questo caso, nell'ultimo step di preparazione, a differenza del metodo classico, le nanoparticelle sono state ricoperte con acido oleico e disperse in cloroformio. A tal riguardo, definiremo la procedura come 'Massart modificato', in modo da distinguerla dalla metodica classica. Le HB\_Ngp sono state quindi preparate seguendo le fasi di preparazione riportate nel sottoparagrafo 2.2.2.1., sino al passaggio relativo alla 1<sup>a</sup> separazione del precipitato nero per centrifugazione. Successivamente, il precipitato è stato ridisperso in acido oleico, invece che acido perclorico, e di seguito nuovamente isolato per centrifugazione. Il precipitato ottenuto è stato, quindi, ridisperso in cloroformio. Le HB\_Ngp ottenute hanno un rapporto percentuale acido oleico: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> di 26:74.

### 2.2.3. Preparazione dei liposomi e dei magnetoliposomi

I liposomi e i magnetoliposomi sono stati preparati a partire dalla fosfatidilcolina di soia (P90) seguendo la metodica della Thin Layer Evaporation (TLE). Riassumendo, i fosfolipidi sono stati disciolti in cloroformio; il solvente organico è stato di seguito evaporato sottovuoto a 40°C, con un evaporatore rotante (Rotavapor R110, Büchi). Il film sottile lipidico ottenuto è stato posto sottovuoto spinto per 24 h e di seguito idratato, in modo da ottenere una concentrazione lipidica finale di 20 mmol l<sup>-1</sup>. L'idratazione è stata svolta sotto agitazione meccanica alla velocità di 2000 rpm/min. per 1 h. Un campione così ottenuto è stato sottoposto a trattamento di sonicazione mediante sonicatore con sonda ad immersione Soniprep, della durata di 5/10 cicli di 30 secondi intervallati da 30 secondi di pausa (intensità 13-13,5 Amplitude).

---

### 2.2.3.1. Preparazione dei magnetoliposomi con *HL\_SPION* (*MLP\_HL*)

In questo caso, il ferro fluido idrofilo, è stato aggiunto durante la fase di idratazione del film sottile o come unico mezzo idratante o in miscela con acqua bidistillata o tampone, in modo tale da raggiungere la concentrazione finale di magnetite desiderata. La quantità di acqua bidistillata o tampone utilizzata per la preparazione della miscela con il ferrofluido è stata quindi calcolata volta per volta, in modo da mantenere costante il volume totale della fase idrofila e la concentrazione lipidica nella dispersione finale.

### 2.2.3.2. Preparazione dei magnetoliposomi con *HB\_SPION* (*MLP\_HB<sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></sub>* e *MLP\_HB* )

Nella fase iniziale di studio sono stati preparati magnetoliposomi a partire dalle *HB\_SPION* disperse in esano, le *HB\_SPION<sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></sub>*, mentre in un secondo tempo sono state utilizzate le *HB\_SPION* allo stato secco. In entrambi i casi le nanoparticelle idrofobiche sono state aggiunte prima della formazione del film sottile. In particolare, nel caso delle *HB\_SPION<sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></sub>*, un volume del ferrofluido apolare è stato unito al cloroformio utilizzato per la dispersione dei fosfolipidi; mentre, le *HB\_SPION* (con la consistenza di una pasta semisolida) sono state pesate in bilancia analitica e di seguito disperse in cloroformio. In questo caso, la quantità pesata è stata sempre pari al doppio della quantità utile al raggiungimento di una determinata concentrazione finale, dato il rapporto percentuale acido oleico: magnetite di 50:50. La dispersione è stata quindi di seguito posta in un bagno ad ultrasuoni per 30 minuti e successivamente unita alla fase lipidica, anch'essa dispersa in cloroformio. Le fasi successive, sia nel caso dei magnetoliposomi ottenuti dalle *HB\_SPION<sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></sub>* (*MLP\_HB<sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></sub>*) che nel caso dei magnetoliposomi ottenuti dalle *HB\_SPION* allo stato secco (*MLP\_HB*), seguono quanto già riportato nella procedura generale; il mezzo di idratazione è stato, in questo caso, l'acqua bidistillata o la soluzione tampone.

---

### 2.2.3.3. Preparazione dei magnetoliposomi con nanoparticelle

#### *Nanogap<sup>®</sup> (MLP\_Ngp)*

Anche in questo caso, come per le HB\_SPION, le nanoparticelle idrofobiche Nanogap<sup>®</sup> sono state aggiunte prima della formazione del film sottile. Le nanoparticelle Nanogap, già disperse in cloroformio alla concentrazione di 2,72 mg/ml, sono state unite al cloroformio utilizzato per la dispersione dei fosfolipidi. Le fasi successive seguono quanto già riportato nella procedura generale; il mezzo di idratazione è stato, anche in questo caso, rappresentato dall'acqua bidistillata o dalla soluzione tampone.

#### 2.2.4. Purificazione dei magnetoliposomi

Una fase importante di caratterizzazione dei magnetoliposomi preparati è stata quella della valutazione della % di magnetite incapsulata, intrappolata o associata alle strutture vescicolari magnetiche ottenute. Date le differenti posizioni che le nanoparticelle magnetiche possono occupare nelle varie strutture vescicolari, internamente nel core acquoso, nei bilayers o addossate alla superficie esterna, abbiamo scelto di utilizzare l'espressione "Associazione (%) 'magnetite/liposomi' (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi)", con la quale possono essere intese tutte le disposizioni possibili.

Le metodiche di purificazione applicate sono state nel complesso 3: dialisi, gel cromatografia e centrifugazione.

In letteratura la tecnica più comunemente applicata è la gel cromatografia<sup>4,5,6,7</sup>; tra le altre metodiche si ritrovano la magnetoforesi<sup>8,9</sup> e la centrifugazione<sup>10,11,12,13</sup>. In alcuni casi si abbina l'applicazione di una forza magnetica al processo di centrifugazione<sup>12</sup>, in quanto la prima permette di separare i magnetoliposomi e la magnetite libera dai liposomi non magnetici, mentre la seconda permette di separare la magnetite libera dai magnetoliposomi, in quanto la magnetite viene solitamente a depositarsi sul fondo della vial. La dialisi, è una tecnica spesso citata nei lavori di De Cupyer<sup>8,9,14</sup> ma non come metodica di purificazione, bensì come fase operativa attraverso la quale si ottengono i cosiddetti *classical magnetoliposomes*.

---

La separazione per gel cromatografia è stata condotta con una colonna Colaver 14/23, Sephadex G50 (Sigma Aldrich, Germania) come fase stazionaria e acqua bidistillata come fase mobile. La quantità di campione caricata in colonna è stata sempre di 300  $\mu$ L.

La purificazione mediante dialisi è stata condotta ponendo la dispersione di magnetoliposomi in una membrana da dialisi (Spectra/Por, 12,000 14,000 MW Spectrum Laboratories, Inc. Canada) posta a sua volta in acqua bidistillata, sotto costante agitazione, con cambio dell'acqua ad ogni ora.

Il processo di centrifugazione è stato svolto su volumi di dispersione di 1 ml con eppendorf da 1,5 mL; il trattamento applicato è stato di 7000 rpm per 20 minuti. Successivamente alla centrifugazione, le varie fasi del campione, visibilmente distinguibili per colore e aspetto, sono state separate, mediante l'utilizzo di micropipette. Le fasi liquide, corrispondenti al surnatante, sono state separate come tali, mentre le fasi sottostanti molto compatte o viscosi, identificabili come un sedimento marrone e un sedimento scuro sottostante, sono state ridisperse in un piccolo volume di acqua bidistillata (200/400  $\mu$ L).

Poichè la dialisi è una delle tecniche di separazione più adatte per molecole o macromolecole di natura idrofilica e la gel cromatografia è la tecnica più utilizzata in letteratura per la separazione della magnetite di natura idrofilica, queste sono state le due metodiche prevalentemente applicate nel caso degli MLP\_HL, sebbene inizialmente si sia cercato di confermare i dati ottenuti anche attraverso la centrifugazione. Questa tecnica è stata invece quella principalmente impiegata nel caso degli MLP\_HB e degli MLP\_Ngp, in quanto non è influenzata dalla natura idrofilica o idrofobica dei materiali coinvolti; ciò nonostante, anche in questo caso, si è cercato inizialmente di applicare tutte le metodiche, incontrando però qualche difficoltà procedurale nel caso della gel cromatografia e della dialisi.

---

### 2.2.5. *Analisi quantitativa della magnetite*

In letteratura le principali metodiche applicate per l'analisi quantitativa del Ferro sono la Spettroscopia ad Emissione Atomica,<sup>6,15,16</sup> e il saggio della *o*-fenantrolina,<sup>10,17,18</sup> da noi più generalmente chiamato Saggio della Magnetite (quantificazione del  $\text{Fe}^{+2}$ ); in alcuni rari casi viene invece indagata direttamente la maghemite o la magnetite presente nel sistema disperso, mediante misura dell'assorbimento nel range dell'UV-visibile.<sup>5</sup>

Nel nostro caso l'analisi è stata condotta, inizialmente mediante misura diretta della magnetite, per misurazione dell'assorbimento allo spettrofotometro UV-Vis (Biochrom, Libra S12), mentre successivamente attraverso l'applicazione del saggio analitico della *o*-fenantrolina.

#### 2.2.5.1. *Analisi diretta della magnetite sul ferrofluido acido (HL\_SPION) e sui relativi magnetoliposomi (MLP\_HL)*

Il ferrofluido contenente HL\_SPION è stato sottoposto ad una scansione allo spettrofotometro UV nel range 200-900 nm, al fine di rilevare la lunghezza d'onda di assorbimento. Il picco è stato visualizzato a 384 nm. Quindi, di seguito, partendo da un ferrofluido di concentrazione 7 mg/ml in HL\_SPION, sono state create 5 dispersioni a concentrazione decrescente per diluizione con acqua bidistillata. In particolare, le concentrazioni stabilite e misurate sono state: 0,1 - 0,065 - 0,05 e 0,0325 mg/ml. Attraverso questa metodica è stata misurata la magnetite presente nelle formulazioni magnetoliposomiali contenenti gli MLP\_HL della **fase 1**. Le dispersioni di magnetoliposomi sono state diluite in metanolo e di seguito analizzate allo spettrofotometro. Questa metodica analitica è stata limitata alla sola 1<sup>a</sup> fase di analisi sugli MLP\_HL in quanto si è rivelata una procedura non precisa e, inoltre, non facilmente applicabile alle nanoparticelle di natura idrofobica.



---

#### 2.2.5.2. *Analisi del Ferro (II) mediante saggio della o-fenantrolina*

Il saggio della *o*-fenantrolina è caratterizzato dall'impiego di una serie di reagenti che comportano il raggiungimento di un volume finale di reazione ben superiore rispetto al volume del campione di partenza. Ciò determina il fatto che, l'analisi quantitativa svolta mediante il saggio risulti più articolata e complessa rispetto ad una classica analisi diretta allo spettrofotometro. In particolare, è possibile che, dato l'elevato grado di diluizione raggiunto durante il saggio, la quantità di ferro presente nel campione di partenza non possa essere rilevata, oppure che, a seconda del volume finale raggiunto, si debba costruire una retta di taratura apposita. Inoltre l'esecuzione corretta del saggio comporta numerose di problematiche legate per es. al pH del sistema, ai tempi di reazione etc.. Data la complessità della procedura e l'elevato numero di prove svolte, le fasi di elaborazione eseguite, per definire il protocollo operativo, potranno apparire prolisse e intricate. E' stato comunque ritenuto opportuno inserire i vari step di elaborazione nella sezione 'materiali e metodi' in quanto necessari a giustificare il protocollo finale effettivamente applicato per l'elaborazione dei risultati. La metodica analitica principalmente seguita è stata quella indicata sul Vogel – Analisi chimica quantitativa- Spettrofotometria e Colorimetria- CEA edizioni, integrata con alcune anche alcune specifiche sulla procedura del saggio riportate su altri lavori presenti in letteratura.<sup>17,18</sup>

##### 2.2.5.2.1. *Procedura operativa*

Poiché la magnetite libera il ferro in essa contenuto per trattamento con acido cloridrico concentrato (37%), è stata preparata una soluzione standard di magnetite in HCl conc. da cui poi, per diluizione con HCl stesso, sono state preparate soluzioni a concentrazione inferiore. Le soluzioni appaiono colorate in giallo, colorazione che va gradualmente schiarendosi al diminuire della concentrazione del ferro presente. In tali soluzioni il ferro si trova nei suoi due stati di ossidazione, Ferro (II) e Ferro (III).

---

Dopo svariati esperimenti preliminari su dei campioni di prova, si è giunti a definire un protocollo standard per lo svolgimento del saggio, di seguito riportato:

0,1 ml di soluzione di magnetite in HCl conc. è stato trattato con altri 0,4 ml di HCl conc. Successivamente, 0,5 ml di idrossilamina cloridrato (10% p/v) sono stati aggiunti al fine di ridurre tutto il ferro (III) presente a Ferro (II). La miscela, lasciata riposare qualche minuto, è stata di seguito trattata con idrossido di sodio  $12 \text{ mol l}^{-1}$  in quantità sufficiente a neutralizzare l'ambiente acido presente (0,5 ml). Al fine di ottenere un pH intorno a 4 sono stati aggiunti 1,2 ml di tampone citrato. La formazione del complesso ferro-fenantrolina infatti avviene e risulta stabile nel tempo ad un pH sia compreso nel range 3-8. In ultimo, sono stati aggiunti 0,7 mL di fenantrolina (0,15% p/v) per formare il complesso arancio con il ferro (II), rilevabile alla lunghezza d'onda di 510 nm. La miscela in questo modo ha raggiunto un volume totale di 3,4 ml a cui sono stati poi aggiunti 2,6 ml di acqua bidistillata, raggiungendo un volume finale di 5ml.

#### 2.2.5.2.2. *Costruzione della retta di taratura*

Dopo aver standardizzato le quantità necessarie per l'esecuzione del saggio e quindi il volume totale, si è proceduto con il calcolo delle concentrazioni di magnetite ottimali su cui costruire la retta di taratura.

Prendendo come riferimento il range di concentrazione di ferro riportato sul Vogel (0,1-0,5 mg di Ferro diluiti in 50 mL totali di reazione: 0,002-0,01 mg/ml di Ferro),<sup>17</sup> è stata calcolata la concentrazione di partenza in magnetite, necessaria ad ottenere delle concentrazioni in Ferro comprese nel range di riferimento.

- Utilizzando 0,1 ml di una soluzione in HCl di magnetite alla concentrazione di 0,1 mg/ml, diluito per aggiunta dei reagenti fino a 5 ml finali, si ottiene una concentrazione in magnetite pari a 0,002 mg/ml che corrisponde, considerando il rapporto molare magnetite (PM 231,54):ferro (PM 55,84) di 1:3, a 0,0014 mg/ml in Ferro, concentrazione leggermente inferiore rispetto al valore minimo di riferimento sopra indicato (0,002 mg/ml).

- 
- Mentre, utilizzando 0,1 ml di una soluzione in HCl di magnetite alla concentrazione di 0,6 mg/ml e portato poi a 5 ml finali, si ottiene una concentrazione di magnetite pari a 0,0176 mg/ml che corrisponde, considerando il rapporto molare magnetite: ferro di 1:3, a 0,008 mg/ml in Ferro, concentrazione molto vicina al valore massimo di riferimento sopra indicato (0,01 mg/ml).

Una volta individuati gli estremi di tale range (0,1-0,6 mg/ml), si è proseguito con la scelta delle concentrazioni intermedie, che sono state rispettivamente di 0,15-0,18-0,21-0,3-0,45 mg/ml. Considerato che nelle formulazioni liposomiali, si possono raggiungere concentrazioni di magnetite molto basse, soprattutto durante il processo di purificazione, si è comunque voluta verificare la rivelabilità della magnetite al di sotto del limite minimo sopra indicato. In particolare sono state indagate le soluzioni di magnetite anche alle concentrazioni di 0,09 e 0,06 mg/ml.

#### *2.2.5.2.3. Applicazione del saggio ai magnetoliposomi*

L'applicazione del saggio della *o*-fenantrolina alle formulazioni liposomiali ha richiesto uno studio preliminare e un successivo adeguamento della metodica classica, riportata al paragrafo precedente, per il fatto che l'analisi quantitativa, in questo caso, non viene eseguita su una soluzione contenente esclusivamente Ferro, ma su una dispersione complessa, contenente oltre alla magnetite anche materiale fosfolipidico organizzato in vescicole. La presenza delle vescicole ha richiesto l'aggiunta ai reagenti del saggio dell'etanolo, solvente impiegato per la rottura di queste strutture. Inoltre il pH di partenza dei campioni vescicolari meno acido delle soluzioni di magnetite, ha richiesto un aumento del volume di HCl utilizzato, al fine di portare i valori di pH della miscela, al termine del saggio, nel range prestabilito.

---

#### 2.2.5.2.4. *Problematiche legate all'uso dell'etanolo*

L'aggiunta dell'etanolo su campioni di prova di magnetoliposomi come primo componente nell'esecuzione del saggio ha determinato l'insorgenza di una serie di problematiche. In particolare, sottoponendo allo stesso saggio due medesimi campioni di magnetoliposomi e ponendo nel primo campione l'etanolo e a seguire tutti gli altri componenti, mentre, nel secondo, tutti i reagenti del saggio e per finire l'etanolo, la colorazione, legata alla formazione del complesso ferro-fenantrolina, non è comparsa in entrambi con la stessa rapidità. Infatti, nel campione in cui l'etanolo veniva aggiunto come ultimo componente, la colorazione è comparsa al momento stesso dell'aggiunta della fenantrolina, mentre, nel campione in cui l'etanolo era già presente al momento dell'aggiunta del complessante, la colorazione è comparsa molto più lentamente. Questa diversità diventa importante nel momento in cui si voglia definire un tempo standard per l'analisi allo spettrofotometro dei campioni sottoposti al saggio; ciò nonostante entrambi i campioni hanno raggiunto lo stesso grado di colorazione finale (e quindi anche lo stesso valore di assorbimento allo spettrofotometro) dopo un periodo di circa 24 h.

L'altra importante problematica riscontrata riguarda l'ottenimento di un campione da sottoporre al saggio perfettamente limpido. L'aggiunta dell'etanolo, infatti, ha come obiettivo quello di distruggere la struttura vescicolare e liberare qualsiasi elemento vi si trovi intrappolato, tra cui l'eventuale magnetite presente. La scomparsa dell'opalescenza viene utilizzata come elemento indicativo della distruzione delle vescicole in cui i componenti non aggregati danno una soluzione limpida.

Al contrario di quanto accade per le dispersioni vescicolari classiche, in cui un basso grado di diluizione con etanolo o metanolo è normalmente sufficiente a destabilizzare il sistema ed ottenere una soluzione limpida, nel caso dei magnetoliposomi e dell'abbinamento dell'etanolo al saggio del ferro tale diluizione non è risultata essere assolutamente univoca e costante.

Infatti, l'aggiunta dell'etanolo come primo componente ha presentato, alcune volte, l'imprevisto di dar luogo, dopo l'aggiunta degli altri reagenti del saggio, ad una dispersione opalescente, che ha richiesto una ulteriore aggiunta di etanolo

---

---

per raggiungere la completa limpidezza. L'aggiunta invece dell'etanolo come reagente finale, ha permesso di misurare la quantità di solvente necessaria per l'ottenimento di una soluzione limpida.

Nonostante queste criticità procedurali, il raggiungimento con entrambe della stessa colorazione finale concede una certa libertà dal punto di vista applicativo, in quanto dimostra che la magnetite va incontro alle medesime fasi di liberazione del ferro e complessazione, ad opera della fenantrolina, sia in presenza delle strutture vescicolari sia in assenza di queste.

Questo comportamento può essere giustificato considerando il 'possibile' effetto destabilizzante operato degli acidi e delle basi forti, utilizzate per il saggio, nei confronti del bilayer fosfolipidico. Infatti, l'HCl concentrato, utilizzato per la liberazione del Ferro dalla magnetite, a contatto con il campione di magnetoliposomi, può, infiltrandosi nella struttura vescicolare, determinarne, seppur non la completa distruzione, una destabilizzazione, con conseguente liberazione del Ferro (II) e del ferro (III) dalle nanoparticelle di magnetite presenti. In questo modo non verrebbero più ad esistere delle entità nanoparticellari (di diametro 8-10 nm), la cui liberazione necessita della completa rottura della vescicola, ma tali unità magnetiche nanostrutturate dovrebbero essersi già disciolte e aver liberato gli ioni ferrici e ferrosi in esse precedentemente contenuti. Ciò comporterebbe la concreta e totale complessazione del ferro da parte della fenantrolina, nonostante la concomitante presenza di entità fosfolipidiche ancora organizzate, non ancora completamente in soluzione. L'aggiunta preliminare dell'etanolo, invece, sembrerebbe rallentare le varie reazioni del saggio.

Per tutte queste considerazioni il saggio sui magnetoliposomi è stato condotto secondo il seguente protocollo:

a 0,1 mL di dispersione di magnetoliposomi sono stati aggiunti 0,5 ml di HCl conc. Di seguito sono stati aggiunti 0,5 ml di idrossilamina cloridrato (10% p/v); al fine di neutralizzare il pH acido della miscela sono stati poi aggiunti 0,5 ml di NaOH 12 mol l<sup>-1</sup> e 1,2 ml di tampone citrato. La complessazione degli ioni ferrosi è stata realizzata mediante l'aggiunta di 0,7 ml di fenantrolina (0,15 p/v).

---

Infine è stata aggiunta una quantità di etanolo sufficiente a raggiungere la totale limpidezza del campione.

*2.2.5.2.5. Esperimenti di approfondimento sul saggio della o-fenantrolina applicato ai magnetoliposomi.*

Al fine di eludere ogni dubbio sulla possibile influenza dell'etanolo sul complesso ferro-fenantrolina, è stato ritenuto opportuno eseguire una serie di saggi a partire dalle medesime soluzioni di magnetite, utilizzate per costruire la retta di taratura, a cui è stato aggiunto l'etanolo come reagente finale. In particolare, a ciascuna miscela del saggio (del volume di 3,4 ml) è stata aggiunta una quantità di etanolo tale da raggiungere i volumi finali di 5, 10, 15, 20 e 25 ml e dopo 24 h è stata letta l'assorbanza allo spettrofotometro. Attraverso le misure di questi campioni sono state costruite 5 rette di taratura.

Inoltre, al fine di verificare che il grado di diluizione non influisse sulla rivelabilità del complesso, tutti i valori di assorbimento delle 5 rette sono stati riportati in un unico grafico, assorbimento verso concentrazione di magnetite nella miscela finale ottenuta, in modo da verificarne l'effettiva linearità.

Successivamente, al fine di escludere un'eventuale interazione tra i fosfolipidi e i reagenti del saggio, la procedura analitica è stata svolta sulle formulazioni liposomiali prive di magnetite e di seguito trattate con quantità crescenti di etanolo (fino a 10 mL totali).

Altra prova è stata quella di andare a verificare, mediante il saggio, l'influenza della presenza di fosfolipidi in campioni contenenti anche la magnetite.

Poiché la costruzione di una retta di taratura per analisi di formulazioni di magnetoliposomi a concentrazione crescente di magnetite risulta poco attendibile e ripetibile, per via delle numerose variabili che incorrono durante la procedura di preparazione, per es. la possibile parziale perdita della magnetite durante le fasi di idratazione, si è preferito eseguire questa prova aggiungendo alle varie soluzioni di magnetite in HCl, una quantità di dispersione liposomiale (non contenente magnetite) pari a quella normalmente coinvolta nel saggio sui magnetoliposomi. In questo caso ciascuna miscela è stata portata a 10 ml finali

---

---

per aggiunta dell'etanolo e la retta ottenuta è stata confrontata con la retta costruita con soluzioni dello stesso volume, ma senza fosfolipidi.

#### 2.2.6. Associazione magnetite-liposomi (%) (LMA%)

Tutte le formulazioni di magnetoliposomi preparate sono state sottoposte al saggio del ferro. Questa analisi è molto importante nel caso dei magnetoliposomi in quanto, durante le fasi di idratazione del film sottile, si è spesso verificata la formazione di un deposito o l'aggregazione di nanoparticelle sia nel pallone di idratazione che nella paletta di agitazione, determinando così una concentrazione reale di partenza in magnetite leggermente inferiore a quella teorica.

Ciascuna formulazione è stata poi sottoposta alla/e relativa/e procedure di purificazione (vedi paragrafo 2.2.4.) e i prodotti ottenuti sono stati nuovamente sottoposti al saggio del ferro.

Nel caso della dialisi, la dispersione vescicolare ottenuta è stata sottoposta al saggio come tale e quindi la concentrazione misurata è stata espressa in % rispetto alla concentrazione del campione di partenza. Nel caso della gel cromatografia, sono state sottoposte al saggio le frazioni opalescenti raccolte e la quantità di ferro in esse contenuta è stata espressa come % della quantità totale presente nei 300 µl di campione caricati in colonna. Nel caso della centrifugazione, sono state sottoposte al saggio le 3 fasi separate:

un surnatante abbastanza fluido (liposomi e magnetoliposomi), un precipitato marrone abbastanza viscoso (prevalentemente magnetoliposomi) e un precipitato scuro di nanoparticelle molto compatto. Per sottoporre al saggio un campione omogeneamente disperso è stata necessaria ridispersione dei precipitati in acqua bidistillata (paragrafo 2.2.4.), nel caso dei precipitati viscosi e compatti. Per valutare la % di magnetite associata ai Liposomi, la quantità di magnetite presente nel surnatante e nel precipitato marrone è stata espressa come % della magnetite totale presente nelle 3 fasi o nel campione di partenza.

In linea generale le equazioni utilizzate sono state le seguenti:

---

**Dialisi LMA (%)** = [concentrazione di magnetite nel campione purificato (mg/ml) /concentrazione di magnetite nel campione non purificato (mg/ml)]  
×100

**Gel cromatografia LMA (%)** =[magnetite totale presente nelle frazioni raccolte (mg)/magnetite totale presente nei 300 µL posti in colonna (mg)] ×100

**Centrifugazione LMA (%)** = [magnetite presente nel surnatante (mg) + magnetite presente nel precipitato marrone (mg)/magnetite totale presente nel campione di partenza (mg)] ×100

#### *2.2.7. Distribuzione % della magnetite nei centrifugati*

L'analisi del contenuto in magnetite delle 3 fasi separate per centrifugazione, sia degli MLP\_HB che degli MLP\_Nanogap, ha permesso di valutare la distribuzione % della magnetite nelle 3 parti rispetto alla quantità di magnetite presente nel campione di partenza.

#### *2.2.8. Liofilizzazione dei magnetoliposomi*

Per testare la possibilità di liofilizzare le formulazioni magnetoliposomiali e quindi consentirne una più lunga conservazione, alcune formulazioni scelte tra gli MLP\_HL e gli MLP\_Ngp, più un bianco di riferimento (rappresentato solo da liposomi privi di magnetite), sono state sottoposte a questo processo di crioessiccamento.

Il crioprotettore utilizzato è stato il trialosio, aggiunto alle formulazioni subito prima di procedere alla liofilizzazione nelle quantità di 1-1,5 e 2 milligrammi per milligrammo di P90. Per ciascuna formulazione è stato misurato il diametro medio idrodinamico prima della liofilizzazione e dopo re-idratazione del liofilizzato, per aggiunta di un volume di tampone identico a quello di partenza.



---

## 2.2.9. Caratterizzazione dei magnetoliposomi

### 2.2.9.1. DLLS, indice di polidispersione e potenziale zeta

L'analisi dimensionale, dell'indice di polidispersione e del potenziale zeta delle strutture vescicolari, magnetiche e non magnetiche, è stata condotta con lo strumento Zen3600 Nanosizer ZS della Malvern mediante la tecnica del Dynamic Laser Light Scattering (DLLS), qualche volta anche definita come Photon Correlation Spettroscopy (PCS) o come Quasi-elastic Light Scattering (QELS). Il campione viene illuminato da un raggio laser e le variazioni d'intensità della luce diffusa dal campione vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento browniano delle particelle all'origine dello scattering. A parità di temperatura e di viscosità le particelle 'piccole' si muovono rapidamente – creando delle variazioni rapide dell'intensità di scattering – mentre le particelle 'grosse' si muovono più lentamente – creando delle variazioni d'intensità lente. Questo fenomeno è alla base della tecnica Dynamic Light Scattering. Grazie ad un auto correlatore, la velocità delle variazioni d'intensità viene misurata e il coefficiente di diffusione delle particelle calcolato dalla funzione di correlazione. L'equazione di Stokes Einstein consente poi di convertire il coefficiente di diffusione in diametro idrodinamico. Il detector è posto a  $173^\circ$  rispetto al raggio incidente sul campione.

La DLLS consente di ottenere inoltre la distribuzione dimensionale definita anche come Indice di Polidispersione (IP) che ci permette di rilevare il carattere mono o polidisperso del sistema sottoposto ad analisi. In linea generale un IP inferiore a 0,4 indica una popolazione particellare discretamente omogenea. L'analisi del potenziale zeta viene effettuata attraverso la tecnica dell'Electrophoretic light scattering che consente di misurare la mobilità elettroforetica di particelle sospese in un liquido. Per misurare la mobilità elettroforetica delle particelle si applica un campo elettrico tra gli elettrodi della cella di misura contenente il campione che, al contempo, viene illuminata da un raggio laser. Le particelle cariche si spostano verso l'elettrodo di segno opposto, creando una variazione di frequenza della luce diffusa dal campione direttamente proporzionale alla mobilità elettroforetica.

---

---

Per le particelle abbastanza piccole o di bassa densità il valore del Potenziale Zeta consente di predire la loro stabilità. Infatti, un valore di potenziale zeta elevato (i.e.  $<-30\text{mV}$  e  $>+30\text{mV}$ ) fa sì che le particelle si respingano e rimangano abbastanza lontane l'una dall'altra, così da limitare al minimo il rischio di agglomerazione, aggregazione e/o flocculazione.<sup>19</sup> Tutte le formulazioni liposomiali sono state sottoposte ad analisi del diametro medio idrodinamico, dell'indice di polidispersione e del potenziale zeta a 24h dalla preparazione e nel tempo, in particolare a 1, 2, 3 e 4 settimane e, per alcune fasi sperimentali, a 2, 3 e 5 mesi. Le formulazioni, conservate in frigorifero a 4°C, prima di ciascuna analisi sono state poste a temperatura ambiente per un tempo sufficiente al loro relativo riequilibrio termico. Inoltre, lo strumento, essendo dotato di una camera termostata a 25°C, ha permesso l'esecuzione delle misure sempre nelle medesime condizioni. Le formulazioni, prima di ciascuna analisi, sono state opportunamente diluite con acqua bidistillata al fine di rendere il campione poco opalescente e ottimale per l'indagine predetta. L'analisi su ciascun campione è stata eseguita tre volte e i valori riportati sono il risultato della media e della deviazione standard delle 3 serie.

#### 2.2.9.2. *Analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)*

L'analisi delle nanoparticelle magnetiche HL\_SPION e HB\_SPION e dei relativi magnetoliposomi è stata condotta attraverso un TEM JEOL 200CX, operante a 200 kV. Le HL\_SPION e le HB\_SPION sono state applicate direttamente su grigiette di rame/carbonio. Gli MLP\_HL e gli MLP\_HB sono stati caricati su grigiette di rame/carbonio 'Formvar'.

L'analisi TEM delle nanoparticelle magnetiche Nanogap e dei relativi magnetoliposomi è stata condotta presso il Dipartimento di Chimica Fisica dell'Università di Santiago de Compostela (Spagna). Sia le nanoparticelle magnetiche che i magnetoliposomi Nanogap sono stati caricati su grigiette rame/carbonio.

Procedura di caricamento dei campioni organici: il campione è stato gocciolato sulla griglietta e ivi lasciato per un tempo variabile tra i 10 e i 20 minuti. Di seguito il campione in eccesso è stato rimosso dalla griglietta mediante della

---

---

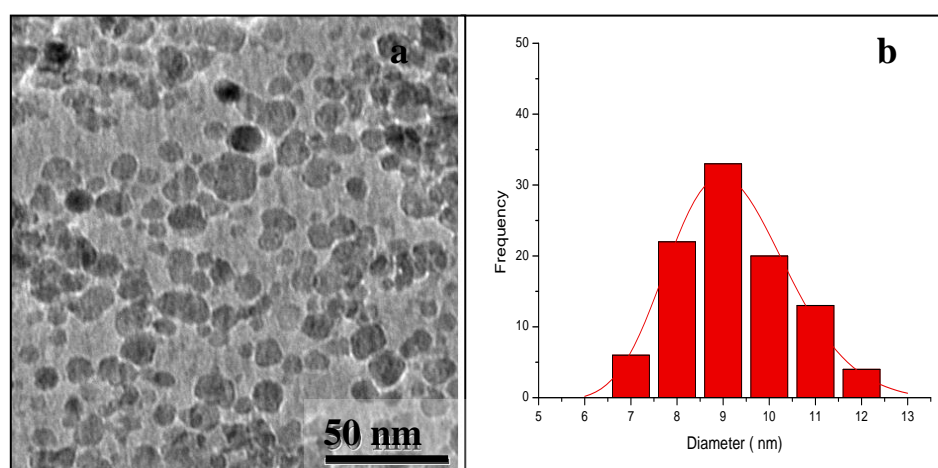
carta assorbente e, al fine di fissare e rendere visibile al TEM il campione di natura organica, una goccia di una soluzione di acido fosfotungstico all'1% è stata su di essa gocciolata e ivi lasciata per un tempo di 2 minuti.

## **2.3. Risultati e discussione**

### **2.3.1. Caratterizzazione DLLS e TEM delle SPION**

#### **2.3.1.1. Le HL\_SPION**

L'immagine TEM delle HL\_SPION (Fig.1 a) mette in evidenza la loro forma arrotondata e un basso grado di aggregazione, il quale conferma la buona stabilità del ferrofluido acido in cui le nanoparticelle si trovano disperse. La distribuzione dimensionale (Fig. 1b), calcolata su un totale di circa 200 nanoparticelle, relative a diverse immagini TEM, ha messo in evidenza un diametro medio di  $9,4 \pm 2,3$  nm.



**Fig.1 a)** Immagine TEM delle HL\_SPION; **b)** distribuzione dimensionale calcolata su un totale di circa 200 nanoparticelle, relative a diverse immagini TEM.

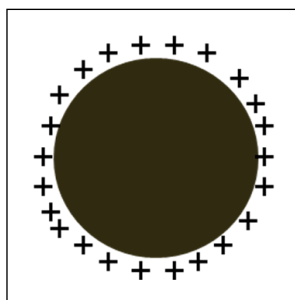
Il diametro medio idrodinamico misurato è stato invece di circa  $38,9 \pm 0,5$  nm, con un IP di  $0,22 \pm 0,01$  ed un potenziale zeta pari a  $+50,5 \pm 1,4$  mV. Il valore dimensionale fornito dall'analisi DLLS conferma quanto già noto relativamente alle differenze tra i valori ottenuti mediante microscopia elettronica e quelli ottenuti per analisi DLLS di nanoparticelle disperse in un fluido. La DLLS infatti, valutando il diametro idrodinamico, tiene conto non esclusivamente del 'core' nanoparticellare ma anche della eventuale struttura superficiale derivante

---

---

dall'inserimento delle nanoparticelle in un fluido, nonché dal tipo di ioni presenti nel mezzo disperdente. Il pH del ferrofluido è risultato oscillare in un range pari a 2-3, quindi nettamente acido. Tuttavia, tale carattere acido non dovrebbe essere imputabile alla presenza di ioni idronio in soluzione, ma alla presenza di ioni ammonio o idronio adsorbiti sulla superficie delle nanoparticelle; quanto appena detto trova giustificazione nel fatto che le HL\_SPION, in seguito alla loro separazione dall'acido perclorico per centrifugazione, sono state sottoposte a numerosi cicli di lavaggio in acqua, i quali dovrebbero aver allontanato totalmente l'acido perclorico precedentemente presente.

Le HL\_SPION, quindi, manifestano nel complesso un carattere nettamente polare tale da permetterne una facile ridispersione in acqua. A tal proposito è stato ritenuto interessante creare una rappresentazione grafica esemplificativa delle HL\_SPION (Fig.2).



**Fig.2** Rappresentazione grafica delle HL\_SPION

Per quanto riguarda il potenziale zeta, il valore nettamente positivo conferma quanto già ipotizzabile sulla base della metodica di sintesi e dei reagenti utilizzati.

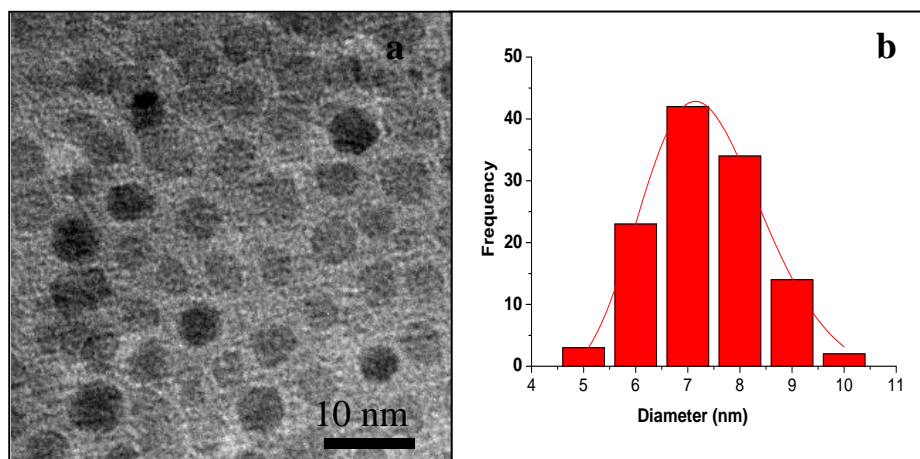
Inoltre, al fine di verificare il potenziale zeta delle nanoparticelle dopo contatto con il tampone fosfato a pH 7 utilizzato per la preparazione dei magnetoliposomi, è stata eseguita un'analisi DLLS del ferrofluido diluito, prima con tampone (per ricreare il rapporto ferrofluido/tampone utilizzato per l'idratazione del film sottile), e, di seguito, con acqua bidistillata (al fine di ricreare la diluizione in acqua eseguita prima delle analisi DLLS). I valori ottenuti sono risultati opposti a quelli ottenuti precedentemente. In questo caso,

---

infatti, il potenziale è risultato essere pari a  $-38,4 \pm 1,2$  mV. Si è quindi supposto che le nanoparticelle di magnetite, aventi disposti sulla superficie gruppi ammonio o idronio caricati positivamente, in presenza del tampone fosfato vadano incontro ad un'ulteriore copertura con ioni fosfato. Tale comportamento potrebbe portare a differenze di carica tra gli MLP\_HL ottenuti per idratazione con la miscela ferrofluido/acqua e quelli ottenuti attraverso la miscela ferrofluido/tampone.

### 2.3.1.2. *Le HB\_SPION*

L'immagini TEM delle HB\_SPION (Fig. 3 a) mette in evidenza la forma sferica e le dimensioni uniformi delle nanoparticelle magnetiche. Inoltre, le nanoparticelle appaiono separate l'una dall'altra in maniera regolare ed omogenea, per via dell'ingombro sterico delle catene idrofobiche dell'acido oleico, esposte superficialmente alle stesse. La distribuzione dimensionale (Fig. 3b), calcolata su un totale di circa 200 nanoparticelle, relative a diverse immagini TEM, ha messo in evidenza un diametro medio di  $8 \pm 1$  nm.



**Fig.3 a)** Immagine TEM delle HB\_SPION; **b)** distribuzione dimensionale calcolata su un totale di circa 200 nanoparticelle, relative a diverse immagini TEM.

Dato il carattere idrofobico delle HB\_SPION, l'analisi DLLS è stata eseguita con apposite cuvette in vetro, previa dispersione in cloroformio delle nanoparticelle allo stato secco e sonicazione per 30 minuti in bagnetto ad ultrasuoni. Considerata l'apolarità delle nanoparticelle e del mezzo disperdente non si è proceduto alla valutazione del potenziale zeta. Anche in questo caso,

come per le HL\_SPION, il diametro idrodinamico è risultato essere superiore rispetto a quello misurato nelle immagini al microscopio. In particolare, come mostrato nella Tabella 1, il valore del diametro medio idrodinamico supera di gran lunga quello valutato al TEM, probabilmente non solo per una differenza legata alla componente idrodinamica ma anche per problemi di instabilità del campione con conseguente aggregazione.

Per approfondire i risultati dell'analisi DLLS, sono stati presi in considerazione i valori di distribuzione dimensionale espressi in termini di intensità, volume e numero, forniti dal software dello strumento.

Come mostrato dalla distribuzione dimensionale espressa in numero, che esprime la misura del numero delle nanoparticelle aventi quelle determinate dimensioni, l'analisi riconosce un'unica popolazione di diametro idrodinamico pari a 11,4 nm, risultato abbastanza in accordo con quanto riportato dall'analisi TEM.

**Tabella 1**

$\langle D \rangle_{\text{DLLS}}$ (nm) <sup>1</sup>	PI	D.D. <sup>2</sup> in intensità	D.D. <sup>2</sup> in volume	D.D. <sup>2</sup> in numero
308,5 ± 34,2	0,35 ± 0,03	272 nm (90,3%) 13,3 nm (9,7%)	12,3 nm (93,5%) 79,2 nm (0,6%) 291,2 nm (5,9%)	11,4 nm (100%)

<sup>1</sup>  $\langle D \rangle_{\text{DLLS}}$  : Diametro medio idrodinamico (nm)

<sup>2</sup> D.D. : Distribuzione Dimensionale

Tali risultati hanno fatto sorgere il sospetto che la ridispersione delle HB\_SPION allo stato secco in cloroformio non fosse in grado di generare un ferrofluido stabile nel corso dell'analisi DLLS, soprattutto se posto a paragone con il ferrofluido in esano, ottenuto con il processo di sintesi applicato. Al fine quindi di rilevare eventuali differenze dovute al solvente utilizzato per la dispersione delle nanoparticelle, sono state eseguite le analisi DLLS anche sulle HB\_SPION disperse in esano e in cicloesano, impostando nello strumento i relativi parametri specifici per i mezzi disperdenti utilizzati. Come è possibile osservare dai risultati riportati in Tabella 2, il diametro medio idrodinamico delle HB\_SPION risulta essere crescente passando dall'esano al cicloesano e da quest'ultimo al

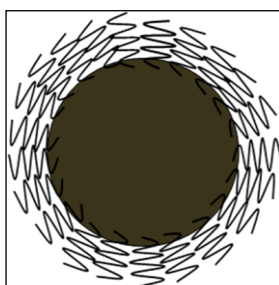
cloroformio. È evidente quindi un'importante influenza del mezzo disperdente nei confronti della stabilità del ferrofluido derivante, soprattutto ai fini dell'analisi DLLS. I 3 solventi utilizzati infatti, pur essendo tutti di natura apolare, presentano un grado di polarità tra loro differente, ed in particolare decrescente dal cloroformio verso l'esano. L'esano, quindi, essendo il solvente utilizzato nella sintesi, risulta essere il più adeguato per la ridispersione delle nanoparticelle magnetiche. Tuttavia, nella **fase 2** degli MLP\_HB non è stato ritenuto necessario sostituire il cloroformio con l'esano per la ridispersione delle HB\_SPION allo stato secco, in quanto queste potrebbero comunque andare incontro ad eventuali fenomeni di aggregazione o instabilità quando vengono miscelate al cloroformio utilizzato per la dispersione dei fosfolipidi.

**Tabella 2**

	$\langle D \rangle_{\text{DLLS}}$ (nm) <sup>1</sup>	IP
HB_SPION esano	23,65 ± 0,21	0,29 ± 0,01
HB_SPION cicloesano	96,09 ± 0,59	0,24 ± 0,02

<sup>1</sup>  $\langle D \rangle_{\text{DLLS}}$  : Diametro medio idrodinamico (nm)

Anche per le HB\_SPION è stato ritenuto interessante creare la rappresentazione grafica della loro configurazione, riportata in Figura 4 dove si può notare la presenza delle catene idrofobiche dell'acido oleico orientate verso l'ambiente circostante che determinano il carattere apolare delle HB\_SPION e la loro affinità verso i solventi organici. L'acido oleico, inoltre, essendo coinvolto sin dai primi step di sintesi delle nanoparticelle potrebbe trovarsi non solo sulla superficie delle nano particelle, ma anche nella struttura più profonda. Il rapporto % acido oleico:Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> rilevato nelle HB\_Spion è stato di 50:50. Inoltre, come confermato da opportune indagini ai raggi X, le HB\_SION sono caratterizzate da forti legami di coordinazione tra i gruppi oleato dell'acido oleico e il Fe (III) della magnetite.



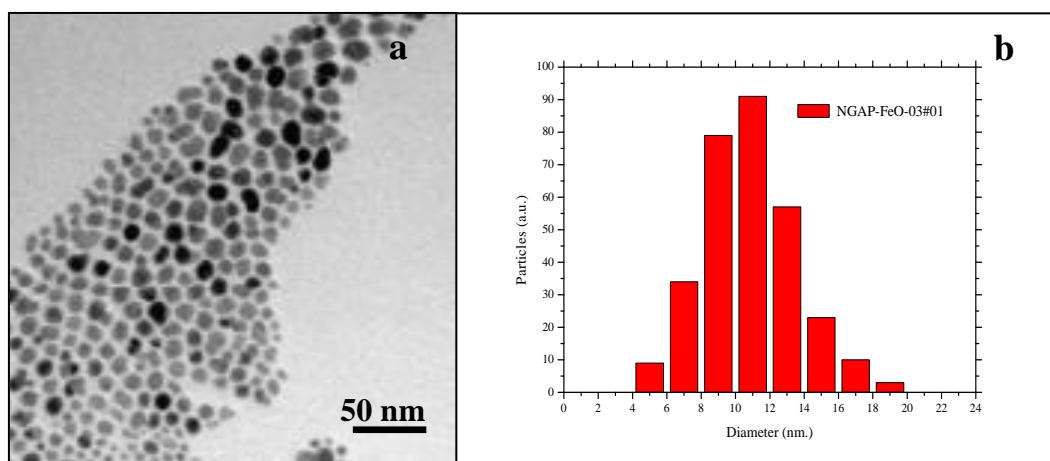
**Fig. 4** Rappresentazione grafica delle HB\_SPION

### 2.3.1.3. *Le HB\_Ngap*

L'immagine TEM delle nanoparticelle Nanogap (Fig.5 a) mette in evidenza la forma sferica e la stretta distribuzione dimensionale delle nanoparticelle magnetiche. Le dimensioni medie calcolate sulla base dell'analisi TEM sono state di  $10,8 \pm 2,7$  nm (Fig. 5b).

In questo caso, diversamente da quanto accaduto per le HB\_SPION, l'analisi DLLS delle nanoparticelle disperse in cloroformio è risultata stabile e ha complessivamente confermato i dati dell'analisi TEM (Tabella 3).

La stabilità nettamente superiore delle nanoparticelle Nanogap rispetto alle HB\_SPION risiede probabilmente nel fatto che le prime risultano già disperse in cloroformio mentre le seconde si trovano allo stato secco e solo in un secondo tempo vengono ridisperse nel solvente apolare.



**Fig. 5 a)** Immagine TEM delle HB\_Ngp; **b)** distribuzione dimensionale delle HB\_Ngp.



**Tabella 3**

$\langle D \rangle_{DLS}$ (nm) <sup>1</sup>	PI	D.D. <sup>2</sup> in intensità	D.D. <sup>2</sup> in volume	D.D. <sup>2</sup> in numero
19,55 ± 0,12	0,09 ± 0,01	21,07 nm (100%)	17,16 nm (100%)	14,74 nm (100%)

<sup>1</sup>  $\langle D \rangle_{DLS}$  : Diametro medio idrodinamico (nm)

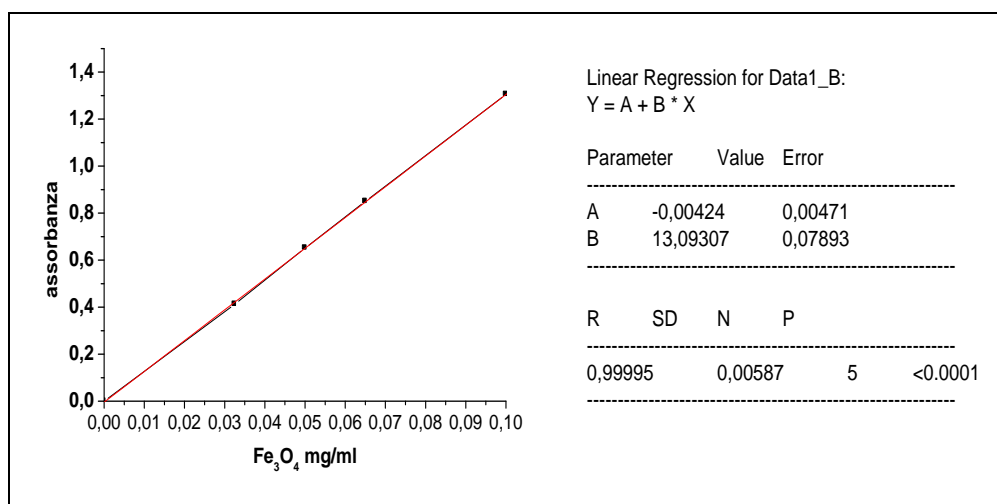
<sup>2</sup> D.D. : Distribuzione Dimensionale

La rappresentazione grafica delle HB\_Ngp può essere simile a quella delle HB\_SPION (Fig.4), in quanto, come queste, presentano una copertura superficiale di acido oleico le cui catene idrofobiche sono orientate verso l'esterno. A differenza della sintesi utilizzata per le HB\_SPION, per le HB\_Ngp l'acido oleico viene aggiunto al termine della preparazione e si dispone solo sulla superficie (sempre attraverso legami di coordinazione con il ferro, come confermato da opportune indagini FTIR).

### 2.3.2. Rette di taratura magnetite

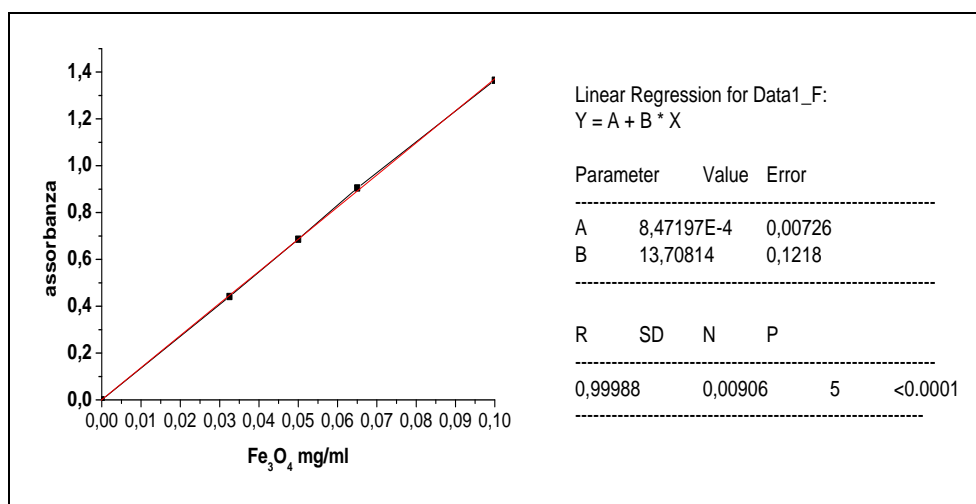
#### 2.3.2.1. Valutazione diretta delle HL\_SPION allo spettrofotometro UV-Vis

Come dettagliatamente riportato nelle sezioni 2.2.5.1 e 2.2.5.2 la valutazione dell'assorbimento delle soluzioni di magnetite (HL\_SPION) alla lunghezza d'onda di 384 nm ha permesso la costruzione della retta di taratura riportata in Figura 6.



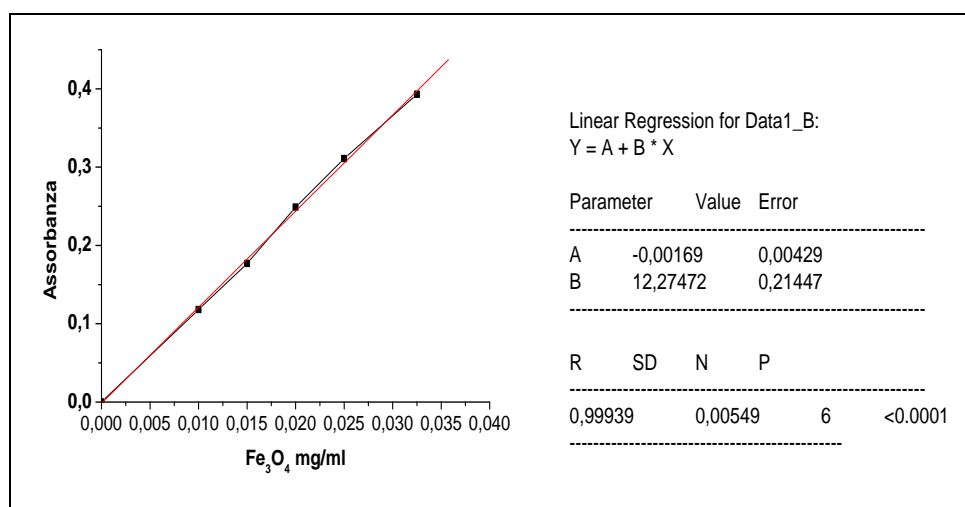
**Fig.6** Retta di taratura delle HL\_SPION.

Dato che per l'analisi quantitativa del  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  presente nei magnetoliposomi è necessario rompere le vescicole con MeOH, la medesima retta è stata costruita con soluzioni diluite con questo solvente, ottenendo il risultato riportato in Figura 7. Questo controllo ha permesso di osservare che l'assorbimento della magnetite per diluizione del ferrofluido con acqua o con metanolo non presenta differenze rilevanti.



**Fig.7** Retta di taratura delle HL\_SPION in metanolo.

Inoltre, al fine di mettere in evidenza se la rivelabilità della magnetite a basse concentrazioni subisse delle variazioni, sono state analizzate diluizioni superiori. Come è possibile verificare dalla retta riportata in figura 8, i parametri della regressione lineare non subiscono delle importanti variazioni significative.



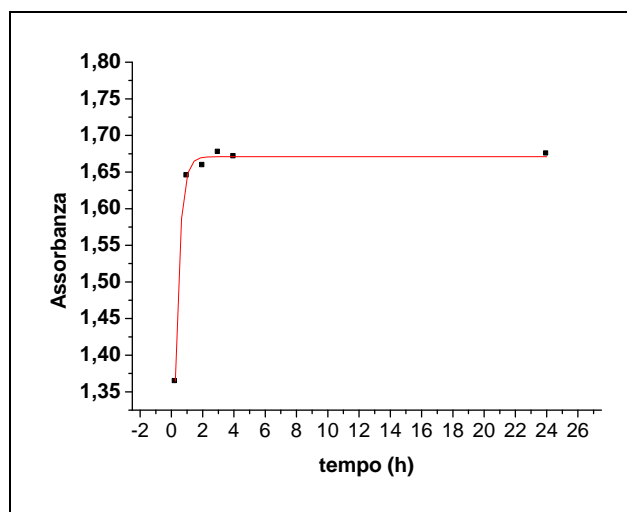
**Fig.8** Retta di taratura delle HL\_SPION in metanolo per basse concentrazioni di magnetite.

---

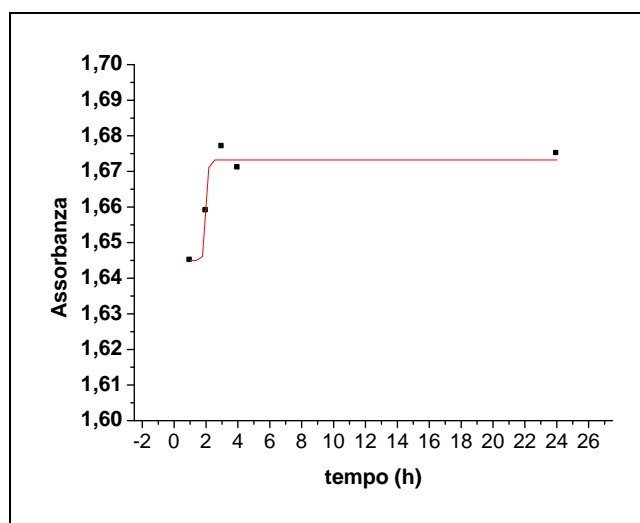
### 2.3.2.2. Saggio della *o*-fenantrolina

#### 2.3.2.2.1 La retta di taratura della magnetite standard.

L'indagine svolta sul protocollo del saggio della *o*-fenantrolina ha riguardato, oltre che la valutazione delle quantità e delle concentrazioni dei reagenti da utilizzare, anche la valutazione del tempo necessario per una corretta determinazione allo spettrofotometro del complesso ferro-fenantrolina. A tal fine una stessa soluzione di magnetite è stata sottoposta a misurazioni a intervalli regolari fino alle 24 h. I risultati ottenuti hanno messo in luce la variabilità del grado di complessazione nel periodo compreso tra il tempo zero (ovvero subito dopo l'aggiunta della fenantrolina) e i 15 minuti successivi (Figura 9); come è possibile osservare nel grafico di Figura 10 anche nelle misure effettuate nell'intervallo temporale tra la 1<sup>a</sup> e la 3<sup>a</sup> ora si può osservare, un certo grado di variabilità, seppur più limitato; mentre, sembrano mostrare una maggiore stabilità le misure comprese tra la 3<sup>a</sup> e la 24<sup>a</sup> h. Considerata la variabilità del complesso sino alla 3<sup>a</sup>- 4<sup>a</sup>h successiva all'esecuzione del saggio e data l'eventualità, in linea generale, di non riuscire a misurare l'assorbimento dei campioni dopo tale specifico intervallo di tempo, si è deciso che la valutazione maggiormente attendibile e ripetibile fosse quella alle 24 h.



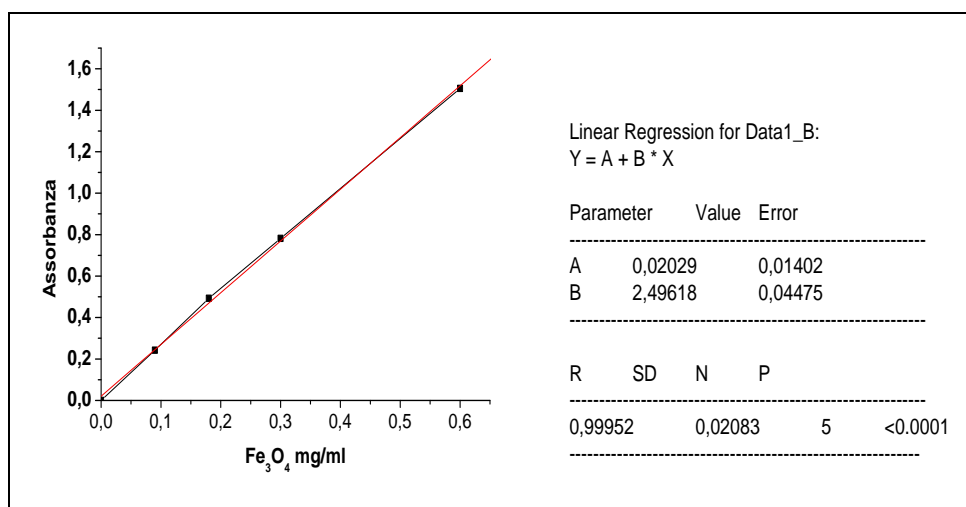
**Fig. 9** Valutazione dell'assorbimento del complesso ferro-fenantrolina in funzione del tempo (intervallo 0-24 h).



**Fig.10** Valutazione dell'assorbimento del complesso ferro-fenantrolina in funzione del tempo (intervallo 0,25-24 h).

Una volta valutato l'intervallo di tempo ottimale per la misurazione del complesso allo spettrofotometro si è proceduto con l'esecuzione della retta di taratura.

Le soluzioni di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  in HCl conc. sono state sottoposte al saggio del ferro e portate ad un volume finale di 5 mL con acqua bidistillata (come indicato nella procedura operativa del paragrafo 2.2.5.2.); trascorse le 24 h le miscele sono state analizzate allo spettrofotometro UV alla lunghezza d'onda di 510 nm. Di seguito, in Figura 11, viene riportata la retta di taratura ottenuta.

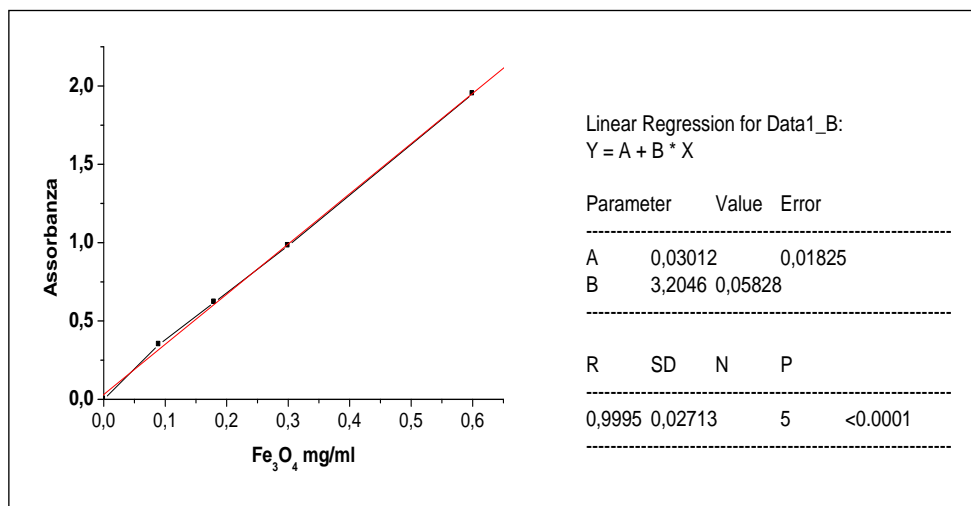


**Figura 11** Retta di taratura della magnetite standard ottenuta mediante saggio della *o*-fenantrolina.

---

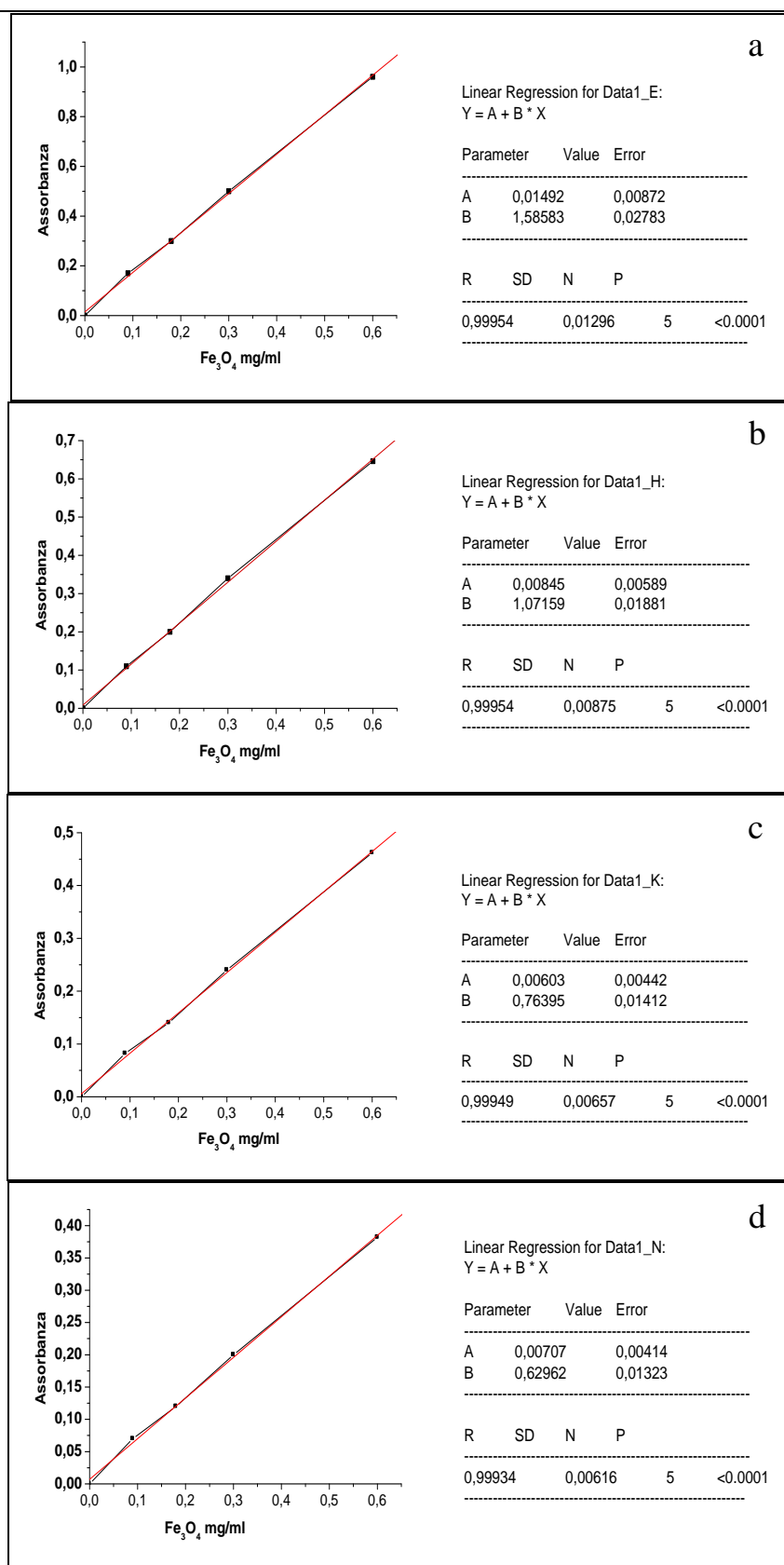
#### 2.3.2.2.2. Sostituzione dell'acqua con etanolo.

Considerata la necessità di impiegare l'etanolo nel saggio, come solvente per distruggere la struttura vescicolare, si è deciso inizialmente di inserirlo in sostituzione dei 2,6 ml di acqua utilizzati nel saggio classico, precedentemente illustrato, ottenendo la retta di Figura 12.



**Fig. 12** Retta di taratura della magnetite standard ottenuta mediante saggio della o-fenantrolina con sostituzione dell'acqua bidistillata con etanolo.

Inoltre, data la possibilità di dover trattare la miscela del saggio con quantità variabili di etanolo, le stesse soluzioni di magnetite in HCl conc. di partenza sono state sottoposte al saggio e diluite con etanolo a 10, 15, 20 e 25 mL totali. Di seguito vengono riportate le relative 4 rette di taratura ottenute (Figure 13 a, b, c e d).

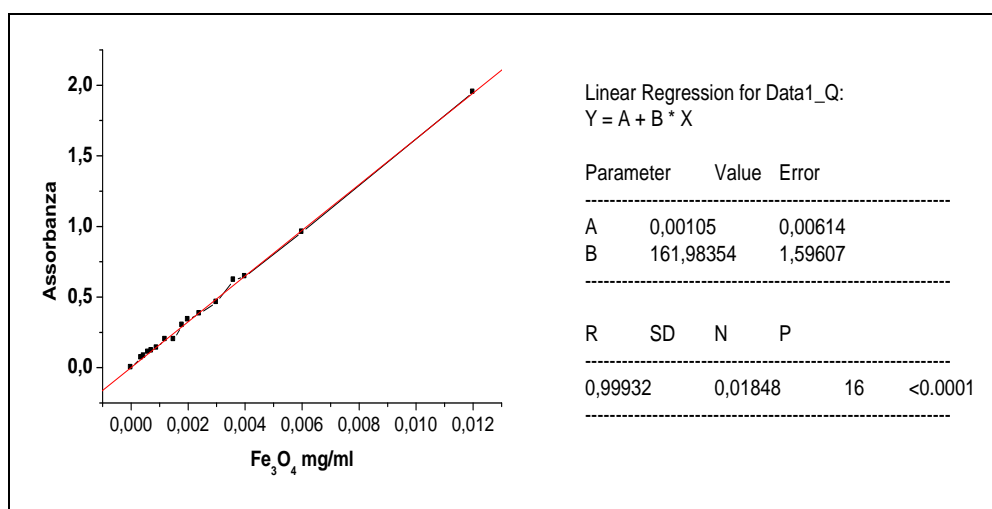


**Fig. 13** Rette di taratura della magnetite standard ottenute mediante saggio della *o*-fenantrolina e diluizione con etanolo fino ad un volume finale di **a)** 10 ml, **b)** 15 ml **c)** 20 ml **d)** 25 ml.

---

#### 2.3.2.2.3. Confronto tra le varie rette di taratura e ulteriori approfondimenti

Al fine di verificare se il grado di diluizione in etanolo potesse influire sulla stabilità del complesso ferro-fenantrolina, ciascun valore di assorbimento misurato durante l'esecuzione delle rette di paragrafo 2.3.2.2.2. è stato posto in funzione della concentrazione in magnetite (mg/ml) effettivamente presente nella miscela finale del saggio. I valori, come è possibile osservare dal grafico di Figura 14, sono risultati essere in linea tra loro, confermando che, anche al più alto grado di diluizione, il complesso viene rivelato proporzionalmente.

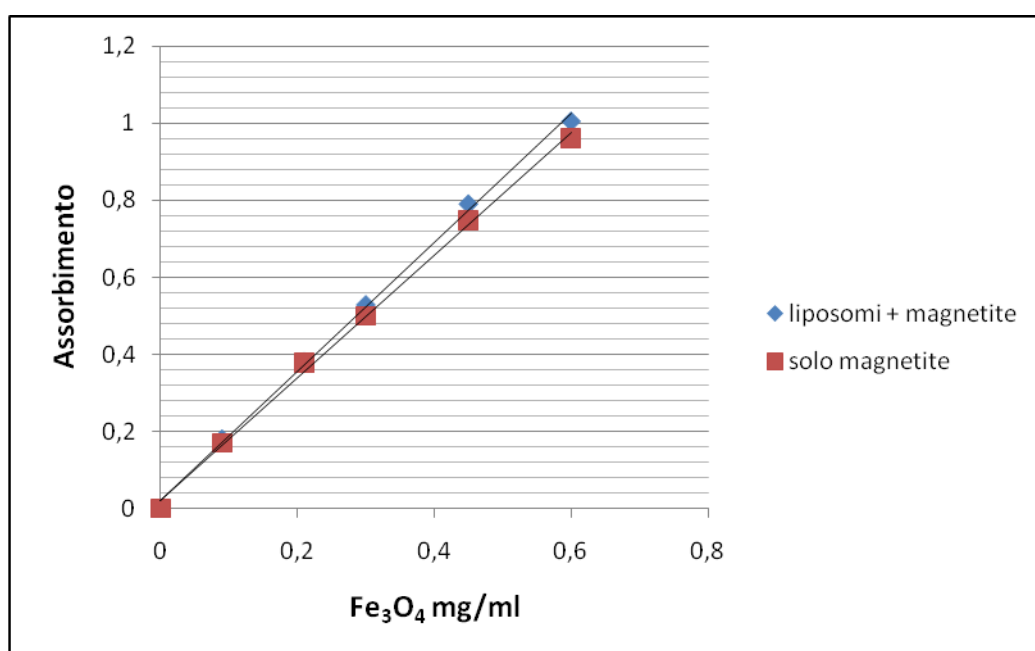


**Figura 14** Retta ottenuta per unione dei valori di assorbimento relativi alle rette riportate in Fig. 13 a, b, c e d posti in funzione delle concentrazioni in magnetite risultanti nelle miscele finali del saggio.

Al fine di verificare la non interferenza dei reagenti del saggio con i fosfolipidi dei liposomi, una stessa formulazione vescicolare, priva di magnetite, è stata sottoposta all'analisi.

In seguito all'aggiunta del complessante, la miscela ottenuta ha sviluppato una colorazione rosacea molto lieve che è poi quasi sparita dopo le diluizioni in etanolo. In particolare, al raggiungimento del volume totale di 10 ml, l'assorbanza (Abs) misurata a 510 nm è risultata essere inferiore a 0,02, mostrando un'influenza trascurabile da parte dei fosfolipidi. Considerata l'interazione, seppur minima, tra i fosfolipidi e i reagenti del saggio del ferro è stato ritenuto opportuno eseguire un'ulteriore prova di approfondimento.

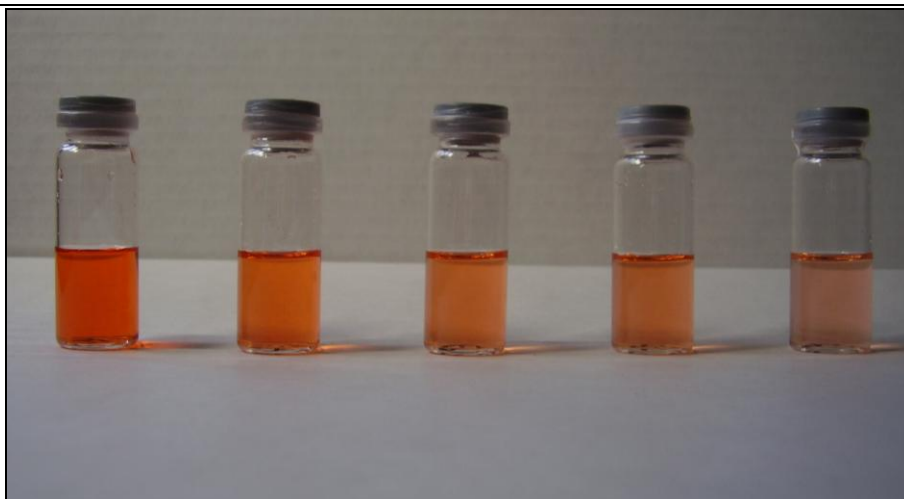
In particolare, una medesima quantità di dispersione liposomiale (priva di magnetite) è stata aggiunta alle soluzioni di magnetite in HCl conc. utilizzate per la costruzione della retta, per poi procedere con l'esecuzione del saggio. Le miscele sono state portate ad un volume finale di 10 mL con etanolo e la retta così ottenuta è stata confrontata con la retta ottenuta a partire dalle stesse soluzioni sottoposte al saggio, ma in assenza della dispersione liposomiale. Come è possibile osservare dal grafico di Figura 15, non sono state rilevate evidenti variazioni di assorbimento tra le due serie di campioni.



**Fig. 15** Paragone tra le rette ottenute per esecuzione del saggio sulla sola soluzione di magnetite e sulla miscela magnetite/liposomi.

Considerate le precedenti valutazioni il saggio della *o*-fenantrolina è stato ritenuto sufficientemente affidabile ai fini della quantificazione della magnetite presente nelle formulazioni magnetoliposomiali. Nella foto di Fig. 16 vengono riportate 5 miscele finali, ottenute per esecuzione del saggio su soluzioni di magnetite standard in HCl conc. a concentrazione decrescente, caratterizzate dalla tipica colorazione rosa-arancio del complesso ferro-fenantrolina.





**Fig. 16** Miscele ottenute per esecuzione del saggio della o-fenantrolina su soluzioni di magnetite a concentrazione decrescente, con sviluppo della tipica colorazione rosa-arancio relativa al complesso ferro-fenantrolina.

### *2.3.3. Le formulazioni magnetoliposomiali*

#### *2.3.3.1. Analisi MLP\_HL – fase 1*

Non essendo stati svolti, nel nostro gruppo di ricerca, precedenti studi sui magnetoliposomi, le HL\_SPION hanno rappresentato il punto di partenza assoluto dello studio sui carrier vescicolari magnetici. A tal proposito si è cercato di portare avanti un programma di lavoro multistep, capace di mettere via via in luce le principali caratteristiche chimico-fisiche dei carrier magnetici vescicolari.

##### *2.3.3.1.1. Caratterizzazione MLP\_HL ad alta concentrazione (MLP\_HL<sub>HC</sub>)*

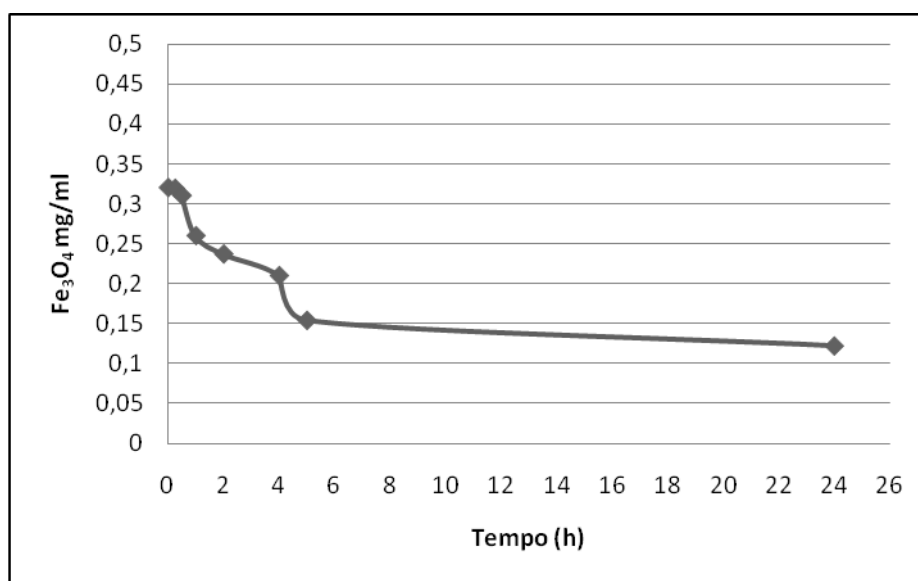
Le prime formulazioni liposomiali con il ferrofluido acido sono state preparate idratando il film sottile con il solo ferrofluido, senza quindi creare la miscela con acqua o tampone e non sono state sottoposte a un processo di sonicazione.

Considerando che la concentrazione di partenza in magnetite del ferrofluido utilizzato è stata di 7 mg/ml, la concentrazione teorica iniziale delle formulazioni sarebbe dovuta essere circa la medesima; in realtà, una quantità significativa della magnetite inizialmente impiegata è andata persa, in quanto parte si è depositata sulle pareti del pallone, parte nei vari elementi di ingranaggio della paletta utilizzata per l'agitazione. Data l'elevata perdita in magnetite verificatasi

---

durante le fasi di idratazione del film sottile, è stato ritenuto utile calcolare la % di magnetite trattenuta nella formulazione rispetto a quella teorica iniziale, posta a contatto con il film sottile, denominandola come %  $Fe_3O_4$  reale. Le formulazioni sono state quindi sottoposte alle procedure di purificazione per gel cromatografia, dialisi e centrifugazione (*Associazione %  $Fe_3O_4$ -liposomi*).

Per risalire al corretto tempo di permanenza del campione nella membrana da dialisi, è stato eseguito uno studio preliminare con prelievi ad intervalli regolari fino alla 24<sup>a</sup> h, sottoposti successivamente al saggio della *o*-fenantrolina. L'analisi dei campioni ha permesso di graficare la concentrazione in magnetite dei campioni in funzione del tempo (h), mettendo in evidenza un plateau tra la 1<sup>a</sup> e la 4<sup>a</sup> ora (Figura 17); valutando questo risultato si è deciso che il tempo ideale per l'esecuzione della dialisi sui campioni MLP\_HL fosse di due ore.



**Fig. 17** Andamento della concentrazione in magnetite di una formulazione magnetoliposomiale sottoposta a dialisi in funzione del tempo.

Sia la %  $Fe_3O_4$  reale, che l'Associazione %  $Fe_3O_4$ -liposomi per dialisi, gel cromatografia e centrifugazione, riportati in tabella 4, sono il risultato della media di 3 valori, ottenuti a partire da 3 distinte formulazioni. L'associazione %  $Fe_3O_4$ -liposomi, calcolata per centrifugazione, tiene conto della magnetite presente nel surnatante e nel corpo di fondo marrone, escludendo la fase del precipitato scuro, separato sul fondo della vial.

**Tabella 4**

% Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> reale	Assoc. % Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -lip. Dialisi	Assoc. % Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -lip. Gel cromatografia	Assoc. % Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -lip. Centrifugazione
30,3±6,4	20,1 ± 12,5	10,3±3,9	19,2±5,1

L'associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi, calcolata attraverso l'applicazione delle 3 metodiche, è risultata essere in tutti i casi abbastanza bassa, mai superiore al 20%; tuttavia, considerando l'elevata concentrazione di magnetite impiegata, il quantitativo caricato risulta essere nel complesso sufficiente. Nella tabella 5, invece, sono riportati i valori di diametro medio, indice di polidispersione e potenziale zeta ottenuti dalle 3 formulazioni MLP\_HL<sub>HC</sub>.

**Tabella 5**

<D> <sub>DLLS</sub> (nm) <sup>1</sup>	IP	Potenziale zeta (mV)
1065 ± 66	0,8 ± 0,1	45,6 ± 3,0

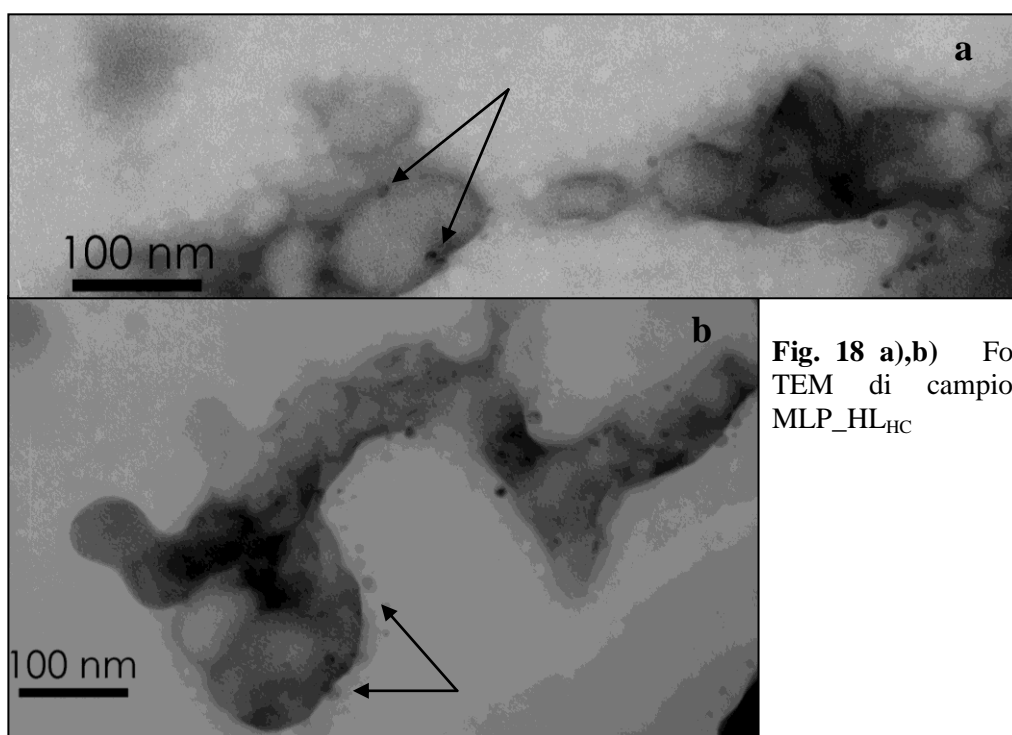
<sup>1</sup> <D><sub>DLLS</sub> : Diametro medio idrodinamico (nm)

Come è facile notare, osservando i valori riportati nella tabella precedente, i campioni non sonicati presentano, in linea generale, un diametro medio di partenza e un indice di polidispersione molto elevati.

Il potenziale zeta, nettamente positivo, è giustificato dal fatto che l'idratazione del film sottile è stata svolta utilizzando il solo ferrofluido acido, che presentava potenziale positivo.

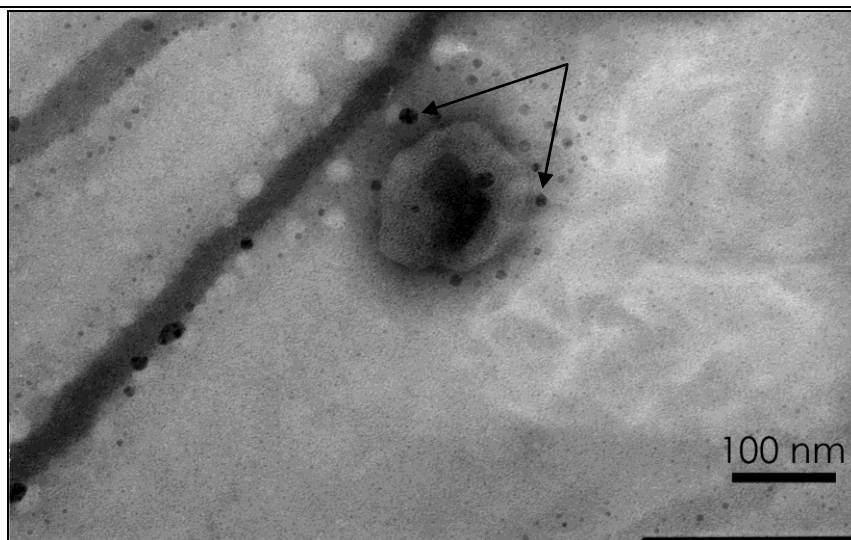
L'analisi TEM dei campioni MLP\_HL<sub>HC</sub> ha messo in evidenza, innanzitutto, l'assenza di magnetite nel core acquoso delle strutture vescicolari, differentemente da quanto sino ad ora riscontrato nei lavori presenti in letteratura sui magnetoliposomi preparati con altri tipi di magnetite di natura idrofila. La magnetite idrofila maggiormente utilizzata negli studi sui magnetoliposomi, preparati mediante TLE, è quella la cui superficie è stabilizzata con citrato, mentre, nel nostro caso, le nanoparticelle idrofile non presentano nessun tipo di rivestimento superficiale, se non la presenza di ioni idronio o ammonio, come risultato finale della sintesi delle nanoparticelle stesse. Ciò farebbe supporre che

la presenza del citrato sia determinante per l'inclusione delle nanoparticelle magnetiche nel core acquoso. Nei nostri campioni, invece, le nanoparticelle si sono disposte lungo i margini dei liposomi stessi, probabilmente per l'affinità superficiale tra le teste polari fosfolipidiche e la superficie nanoparticellare, come mostrato nelle foto di Figura 18 a e b. Come è facile osservare, inoltre, i campioni risultano abbastanza disomogenei e caratterizzati dalla presenza di numerosi aggregati vescicolari.



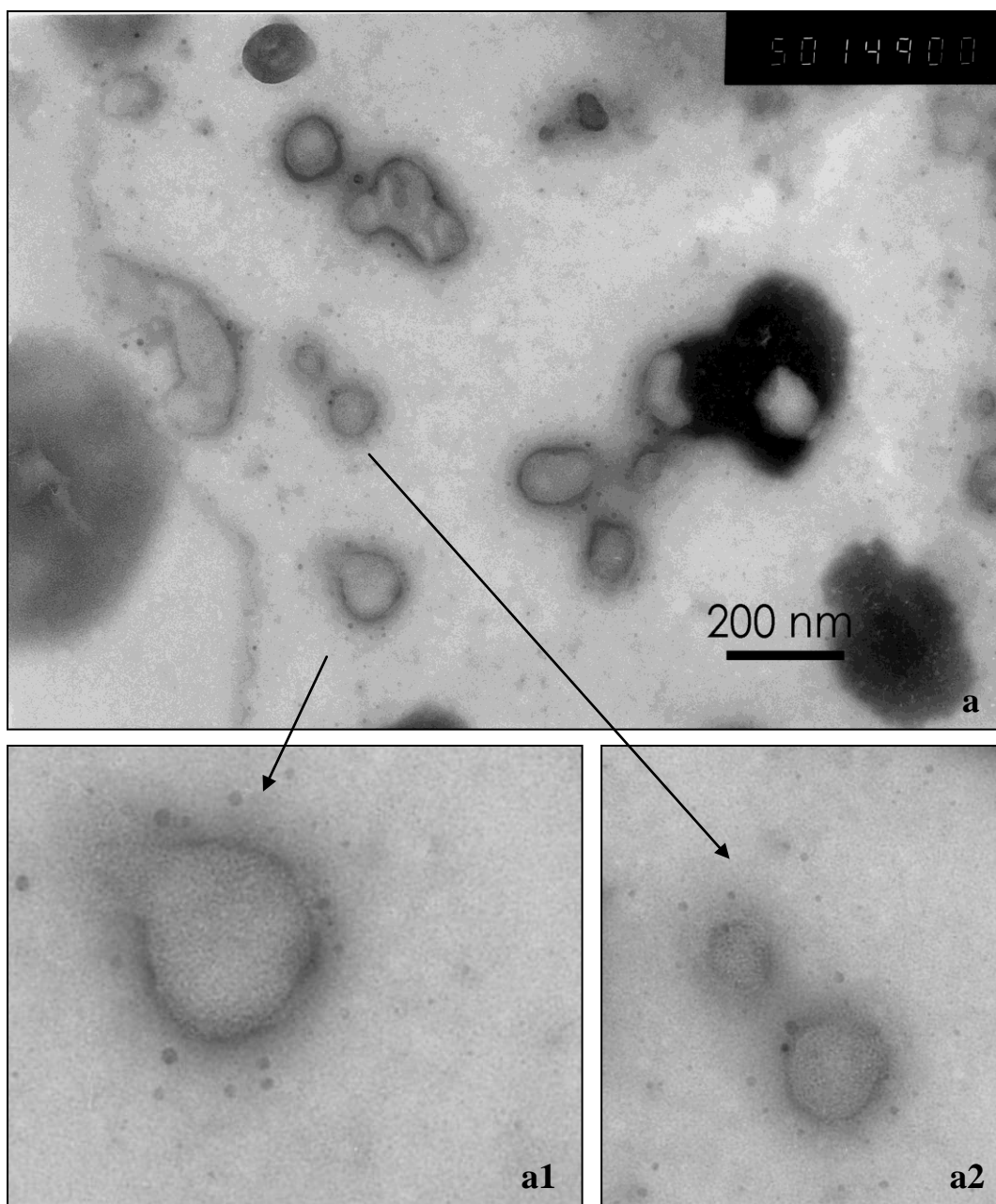
**Fig. 18 a),b)** Foto TEM di campioni MLP\_HL<sub>HC</sub>

La disposizione della magnetite lungo la superficie esterna dei liposomi è osservata anche nelle immagini TEM della frazione raccolta dalla gel cromatografia, come riportato nella foto di Figura 19.



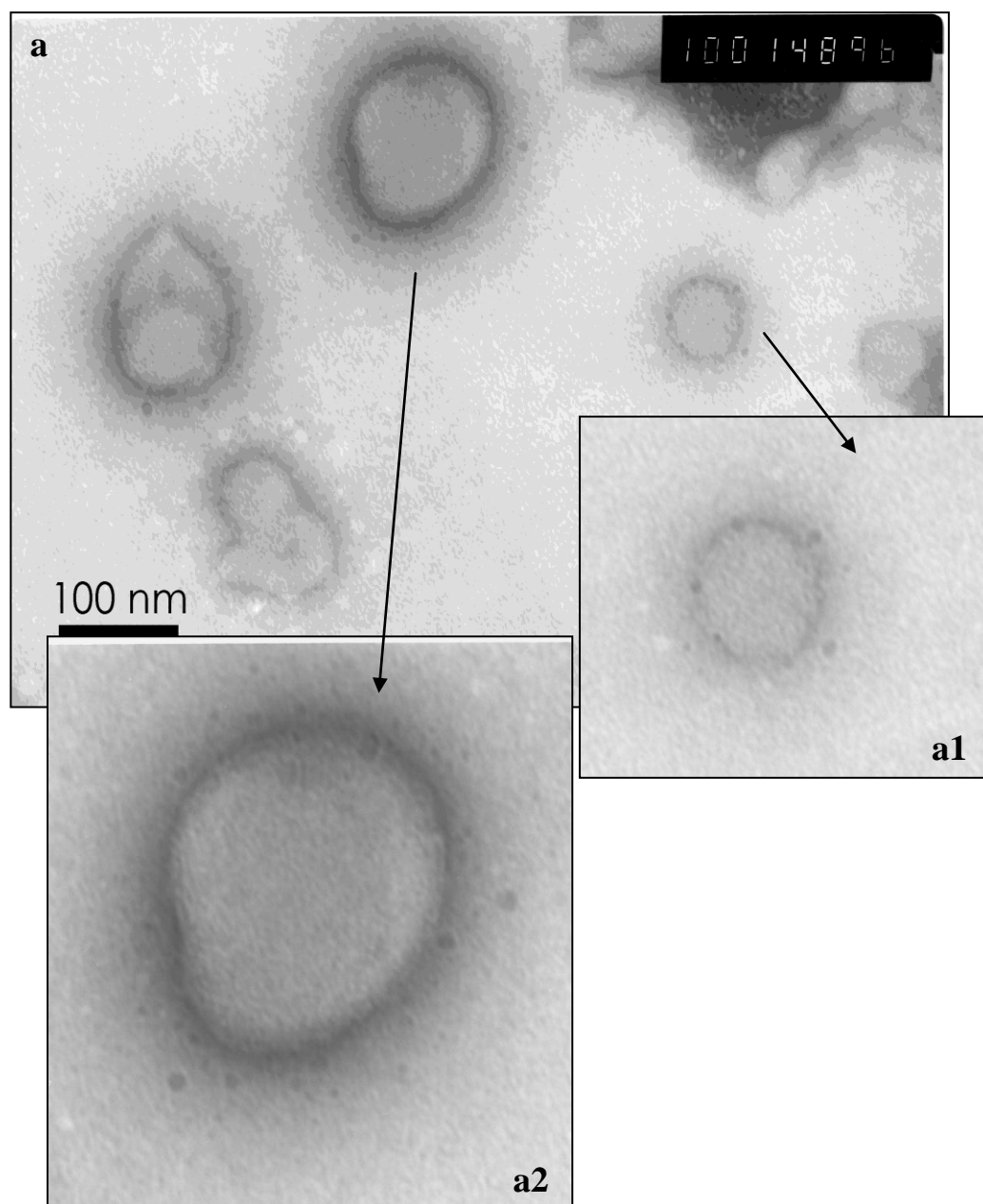
**Fig. 19** Immagine TEM della frazione raccolta dalla gel cromatografia di un campione MLP\_HL<sub>HC</sub>

Anche per semplice analisi visiva le formulazioni hanno mostrato sin da subito una scarsa stabilità, andando incontro, se lasciate a riposo per un periodo di circa 1-2h, alla separazione di un sedimento molto scuro (verosimilmente di sola magnetite), di un corpo di fondo di colore marrone e di un surnatante più o meno opalescente. Tale separazione non è irreversibile, ma per semplice agitazione manuale o meccanica è possibile riottenere una dispersione abbastanza omogenea. Per analizzare la morfologia delle strutture presenti nelle 3 diverse fasi attraverso l'analisi TEM, ciascuna formulazione, omogeneamente ridispersa, è stata sottoposta al processo di centrifugazione, in modo da indurre una più netta separazione delle fasi. Le foto riportate nelle figure 20 a), a1), a2) e 21 a), a1), a2), relative alla fase superiore del surnatante, hanno confermato quanto già visualizzato nel campione non centrifugato, ovvero la distribuzione delle nanoparticelle sulla superficie liposomiale. Il campione, in questo caso, è apparso molto più omogeneo e pulito.



**Fig. 20 a)** Immagine TEM del surnatante separato per centrifugazione di un campione MLP\_HL<sub>HC</sub>; **a1)** e **a2)** particolari dell'immagine TEM **20 a)**.



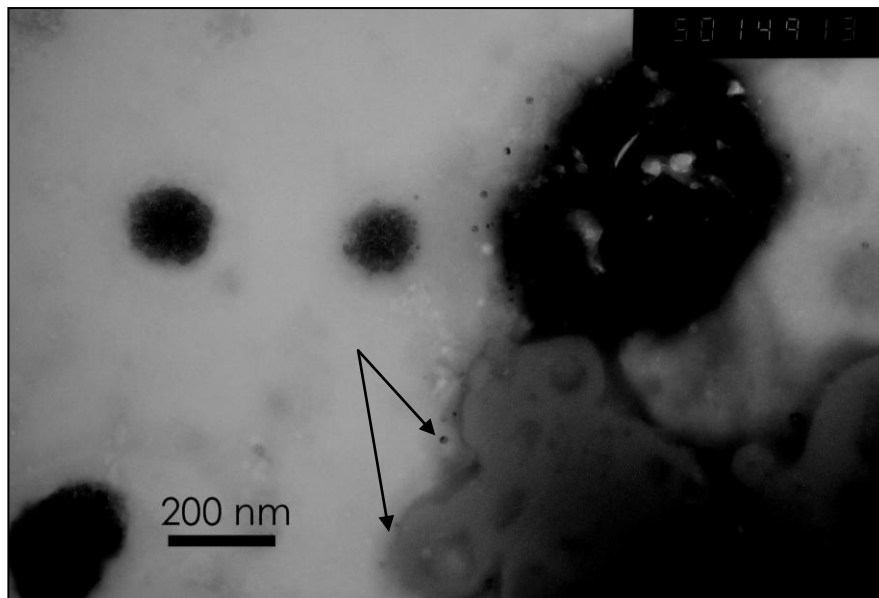


**Fig. 21 a)** Altra immagine TEM del surnatante separato per centrifugazione di un campione MLP\_HL<sub>HC</sub>; **a1)** e **a2)** particolari dell'immagine TEM **21 a)**.

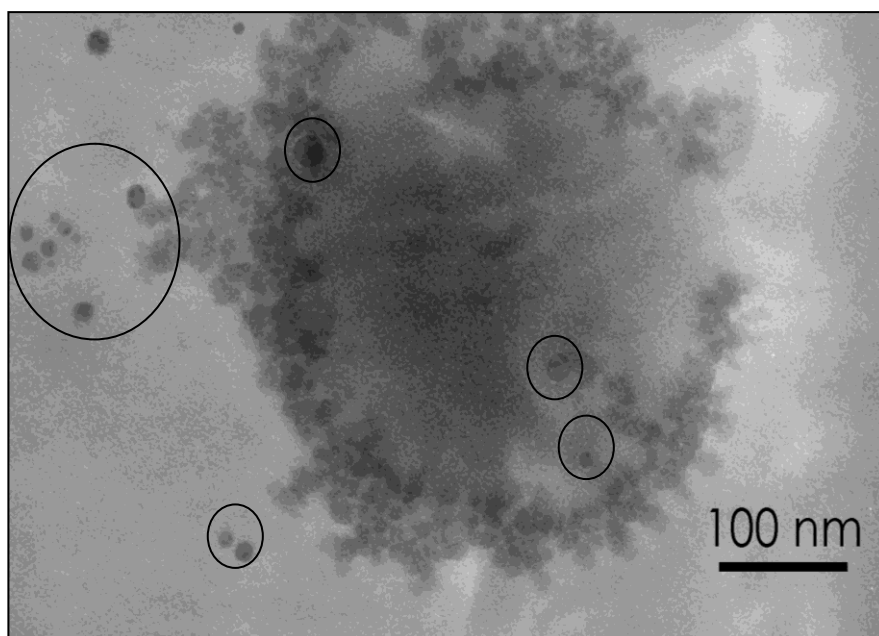
Anche nel corpo di fondo marrone, riportata nella foto di Fig. 22, sono presenti strutture di forma irregolare, presumibilmente riconducibili a materiale fosfolipidico, circondate da nanoparticelle magnetiche; nel sedimento scuro

---

invece, riportato nella foto di Figura 23, sono presenti soprattutto nanoparticelle magnetiche libere e aggregate fra loro, come ipotizzato inizialmente.



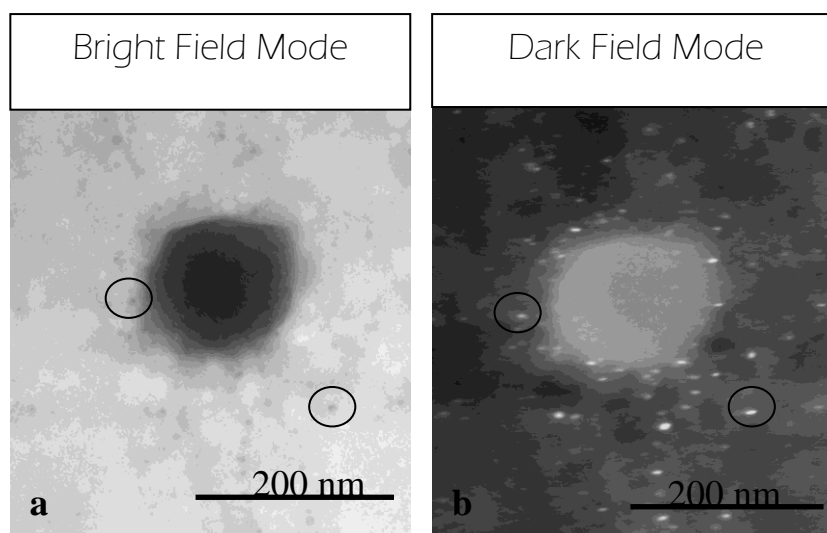
**Fig. 22** Immagine TEM relativa al precipitato marrone separato per centrifugazione di un campione MLP\_HL<sub>HC</sub>.



**Fig. 23** Immagine TEM relativa al precipitato scuro separato sul fondo della vial per centrifugazione di un campione MLP\_HL<sub>HC</sub>.



Al fine di verificare che le formazioni sferiche, di dimensioni nanometriche, presenti in prossimità o addossate alle superfici liposomiali fossero effettivamente nanoparticelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , è stato ritenuto opportuno eseguire foto a livello di una stessa zona di un campione magnetoliposomiale sia in modalità Bright Field che in modalità Dark Field. Come è possibile osservare dalle foto TEM riportate in Figura 24 a) e b), la struttura centrale, di dimensioni intorno ai 200 nm, non sviluppando alcuna diffrazione in modalità Dark Field, comprova la propria natura organica, amorfa, chiaramente identificabile nella struttura fosfolipidica; i punti luminescenti visibili lungo tutto il margine del colloide fosfolipidico, sviluppando la diffrazione, dimostrano un carattere cristallino, inorganico, associabile alle nanoparticelle di  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .



**Fig 24** a) Immagine TEM in modalità Bright Field; b) immagine TEM in modalità Dark Field dello stesso quadro raffigurato in 24 a).

È quindi possibile asserire con certezza che le HL\_SPION interagiscono con la superficie esterna delle strutture vescicolari, probabilmente attraverso forze elettrostatiche o legami ionici. Tale interazione sembrerebbe inoltre possedere una certa stabilità, considerata la sua persistenza anche dopo processi destabilizzanti quali la centrifugazione (foto di Figg. 20, 21) e la gel cromatografia (foto di Fig. 19).

---

#### 2.3.3.1.2. Conclusioni

Le formulazioni MLP\_HL<sub>HC</sub> hanno permesso di delineare le caratteristiche principali delle formulazioni magnetoliposomiali preparate con le HL\_SPION. La non inclusione delle nanoparticelle magnetiche nel core acquoso potrebbe comportare lo svantaggio, in un'ipotetica applicazione in vivo, di un facile distacco delle stesse dalla superficie liposomiale, determinando così la perdita, da parte del magnetoliposoma, delle proprietà magnetiche necessarie per direzionarle sfruttando il targeting fisico. Tuttavia, la permanenza delle nanoparticelle sulla superficie liposomiale dopo i trattamenti della centrifugazione e della gel cromatografia potrebbe dimostrare una buona stabilità delle stesse in talune configurazioni. Se l'interazione nanoparticelle magnetiche-fosfolipidi fosse, quindi, sufficientemente resistente agli stimoli esterni e all'eventuale mezzo di diluizione in cui i carrier magnetici potrebbero essere immessi, gli MLP\_HL potrebbero rappresentare dei carrier dotati di ottime potenzialità, in quanto caratterizzati da un core acquoso completamente libero, potenzialmente sfruttabile per la veicolazione di farmaci idrofili.

#### 2.3.3.2. Analisi MLP\_HL – fase 2

Considerata l'irregolarità e la disomogeneità dei campioni MLP\_HL<sub>HC</sub>, valutata attraverso le immagini TEM (foto di Fig. 18 a, b), e considerata la perdita notevole di magnetite, pari circa al 70% della quantità utilizzata inizialmente, si è deciso di proseguire lo studio definendo un programma di lavoro articolato in 3 formulazioni a concentrazioni crescenti in magnetite, partendo da valori di gran lunga inferiori ai 7 mg/ml applicati nella **fase 1**. Inoltre, al fine di ridurre le dimensioni e la polidispersione delle formulazioni magnetoliposomiali, si è deciso di applicare il processo di sonicazione.

##### 2.3.3.2.1. Caratterizzazione MLP\_HL 1, 2, 3 - miscela ferrofluido/acqua

Le formulazioni MLP\_HL 1, 2 e 3 sono state preparate idratando il film sottile con una miscela di ferrofluido e acqua bidistillata tale da raggiungere la

concentrazione lipidica finale di 20 mmol L<sup>-1</sup> e la concentrazione finale in magnetite prestabilita.

Nella tabella seguente (Tab. 6) sono indicate le formulazioni preparate:

**Tabella 6**

Formulazione	Conc. lipidica mmol/L	Conc. HL_SPION mmol/L	Conc. in HL_SPION mg/ml
MLP_HL 1	20	0,17	0,04
MLP_HL 2	20	0,86	0,2
MLP_HL 3	20	1,51	0,35

Tutte le formulazioni sono state sottoposte al processo di sonicazione rispettando i parametri di 5 cicli della durata di 30 secondi, intervallati da 30 secondi di pausa, con Amplitude uguale a 13. Inoltre, tutte le formulazioni, sia sonicate che non sonicate, sono state sottoposte ad analisi DLLS e del potenziale zeta al giorno 1 e ogni settimana a seguire per un mese. Durante questo periodo le formulazioni sono state conservate in frigorifero alla temperatura di 4°C e prima di ogni analisi sono state lasciate stemperare sino a temperatura ambiente e di seguito sottoposte ad un breve trattamento al vortex.

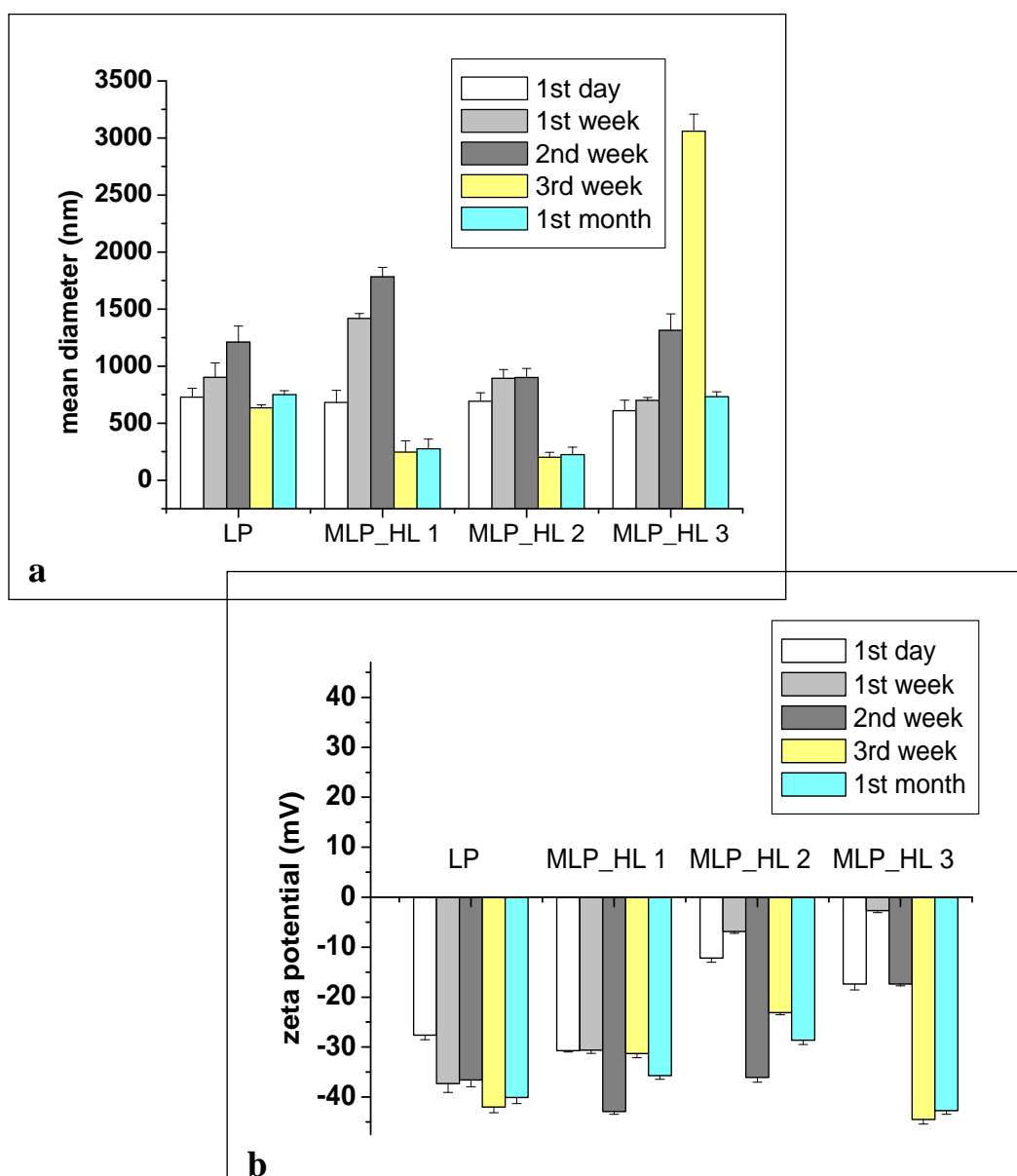
Osservando il grafico a) di Figura 25, che riporta l'andamento del diametro medio idrodinamico nel tempo, è possibile rendersi conto del fatto che tutte le formulazioni non sonicate partono da valori molto elevati, superiori ai 500 nm, i quali tendono ad aumentare nelle settimane successive fino alla 3<sup>a</sup> o 4<sup>a</sup> settimana, quando si osserva una caduta netta che indica la completa alterazione del campione. Osservando la tabella 7, relativa all'indice di polidispersione, è facile rendersi conto del fatto che tutti i campioni risultano polidispersi e che col passare del tempo la disomogeneità del campione aumenta, portando a valori non determinabili (*n.d.*).

I dati relativi al potenziale zeta riportati nel grafico b) di Figura 25, mostrano che i valori del campione MLP\_HL1 sono paragonabili a quelli del cosiddetto bianco (LP), ovvero i liposomi privi di magnetite, mentre i campioni MLP\_HL2 e MLP\_HL3 presentano valori più vicini allo zero.

Quanto appena detto trova facile giustificazione nel fatto che, utilizzando per l'idratazione del film sottile una miscela ferrofluido/acqua e sapendo che il ferrofluido presenta di per sé un potenziale nettamente positivo, all'aumentare del rapporto volumetrico ferrofluido/acqua bidistillata anche il potenziale della dispersione ottenuta aumenta. Tale differenza di potenziale zeta viene giustificata anche dalla distribuzione spaziale delle nanoparticelle, già verificata nei campioni MLP\_HL<sub>HC</sub>; infatti, le HL\_SPION, distribuendosi sulla superficie delle strutture vescicolari e avendo di per sé un potenziale zeta positivo, all'aumentare della loro concentrazione dovrebbero andare a coprire, via via, una superficie vescicolare sempre maggiore, determinando una variazione del relativo potenziale zeta. Nonostante ciò, anche il potenziale zeta delle formulazioni MLP\_HL2 e MLP\_HL3 dopo la 2<sup>a</sup> o 3<sup>a</sup> settimana tende ad assumere valori simili al bianco e alla formulazione MLP\_HL1. Ciò potrebbe essere indice di perdita o distacco delle nanoparticelle magnetiche dalla superficie vescicolare.

**Tabella 7**

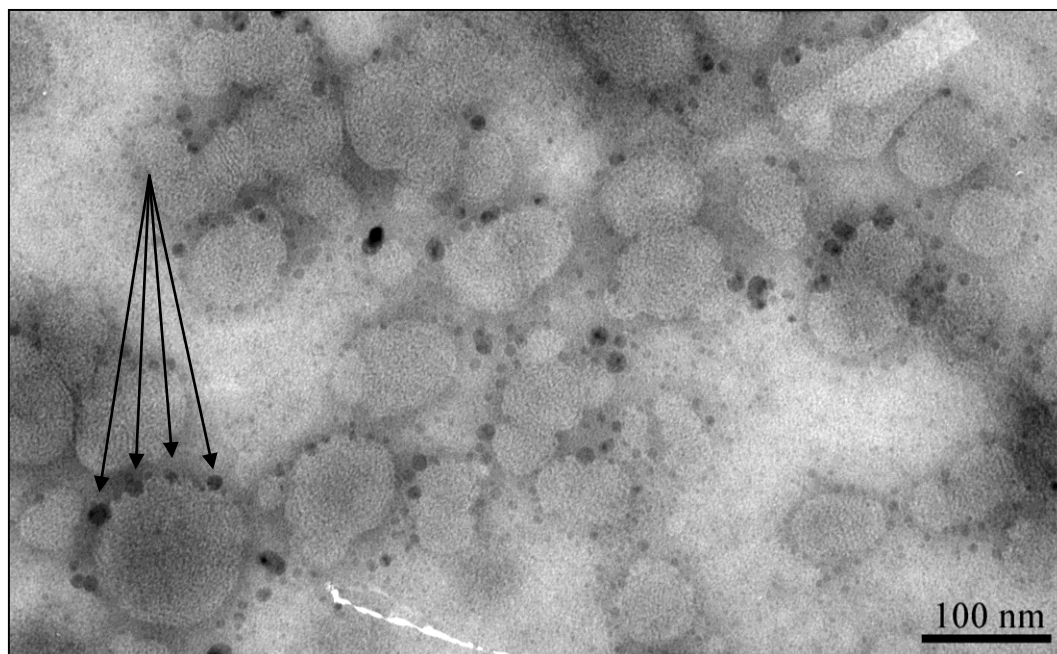
	<b>1<sup>st</sup> day</b>	<b>1<sup>st</sup> week</b>	<b>2<sup>nd</sup> week</b>	<b>3<sup>rd</sup> week</b>	<b>1<sup>st</sup> month</b>
<b>LP</b>	0,75 ± 0,07	0,75 ± 0,02	0,79 ± 0,04	0,58 ± 0,02	0,65 ± 0,03
<b>MLP_HL1</b>	0,66 ± 0,02	0,84 ± 0,041	0,92 ± 0,00	0,52 ± 0,16	<i>n.d.</i>
<b>MLP_HL 2</b>	0,68 ± 0,12	0,69 ± 0,03	0,51 ± 0,15	0,56 ± 0,19	<i>n.d.</i>
<b>MLP_HL 3</b>	0,37 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,80 ± 0,07	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>



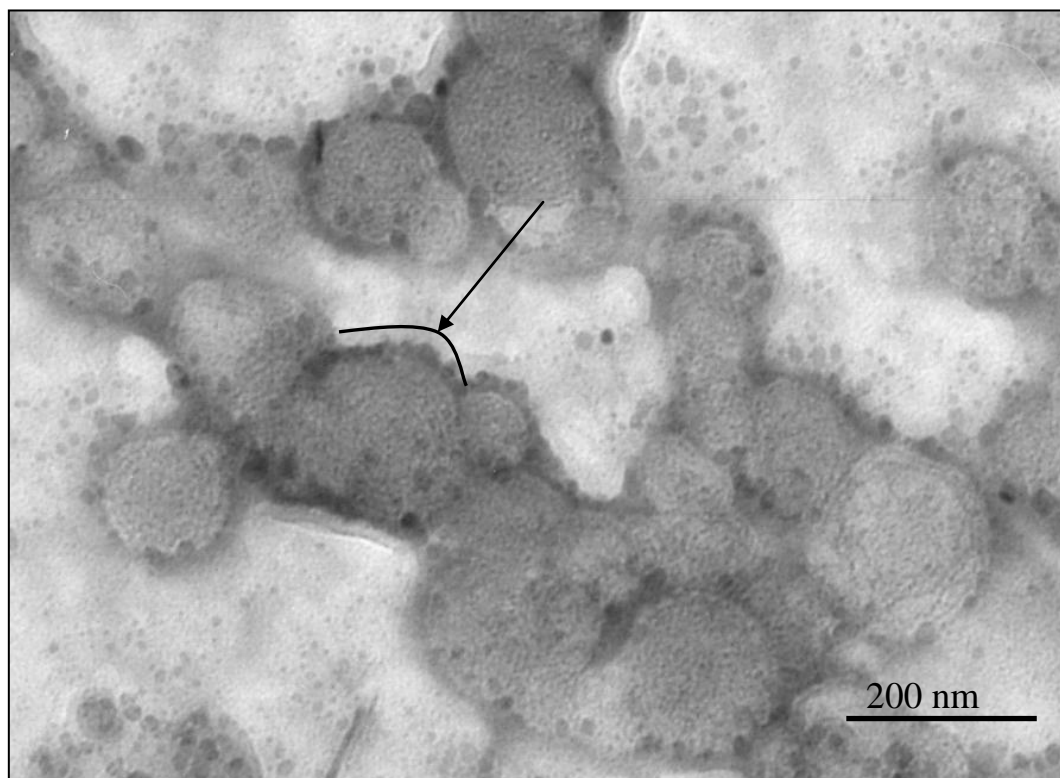
**Fig. 25 a)** Diametro medio idrodinamico del bianco (LP) e delle formulazioni magnetoliposomiali (MLP\_HL 1, 2 e 3) in funzione del tempo; **b)** potenziale zeta del bianco (LP) e delle formulazioni magnetoliposomiali (MLP\_HL 1, 2 e 3) in funzione del tempo.

L'analisi TEM del preparato MLP\_HL1 (foto di Fig. 26) mostra la presenza delle nanoparticelle magnetiche lungo tutta la superficie vescicolare, configurazione ancora più evidente nel preparato MLP\_HL3 (foto di Fig.27), andando a confermare quanto già valutato nella **fase 1**. Una caratteristica visibile nelle foto TEM, che distingue i campioni MLP\_HL<sub>HC</sub> dai campioni MLP\_HL non sonicati, è la presenza, in questi ultimi, di strutture oligo/multilamellari,

invece assenti negli MLP\_HL<sub>HC</sub>, seppur non sonicati. Ciò fa supporre che l'aumento notevole della concentrazione in magnetite nelle formulazioni liposomiali possa impedire la formazione della struttura multilamellare.



**Fig. 26** Immagine TEM di un campione MLP\_HL1 non sonicato.



**Fig. 27** Immagine TEM di un campione MLP\_HL3 non sonicato.

Per quanto riguarda l'associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi riportata in tabella 8, è possibile osservare come i valori ottenuti dopo purificazione per dialisi risultino essere tutti abbastanza elevati e simili tra loro, come anche accade per le due formulazioni purificate per gel cromatografia; il valore misurato invece sulla formulazione 2 purificata per centrifugazione, pur rimanendo elevato (> 50%), si discosta notevolmente dai valori raccolti sullo stesso campione per dialisi e gel cromatografia.

**Tabella 8**

<b>Campioni non sonicati</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip. Dialisi</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip Gel cromatografia</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip. Centrifugazione</b>
MLP_HL1	91,6	91,1	<i>n.d</i>
MLP_HL2	80,8	93,8	57,7
MLP_HL3	88,4	<i>n.d.</i>	<i>n.d</i>

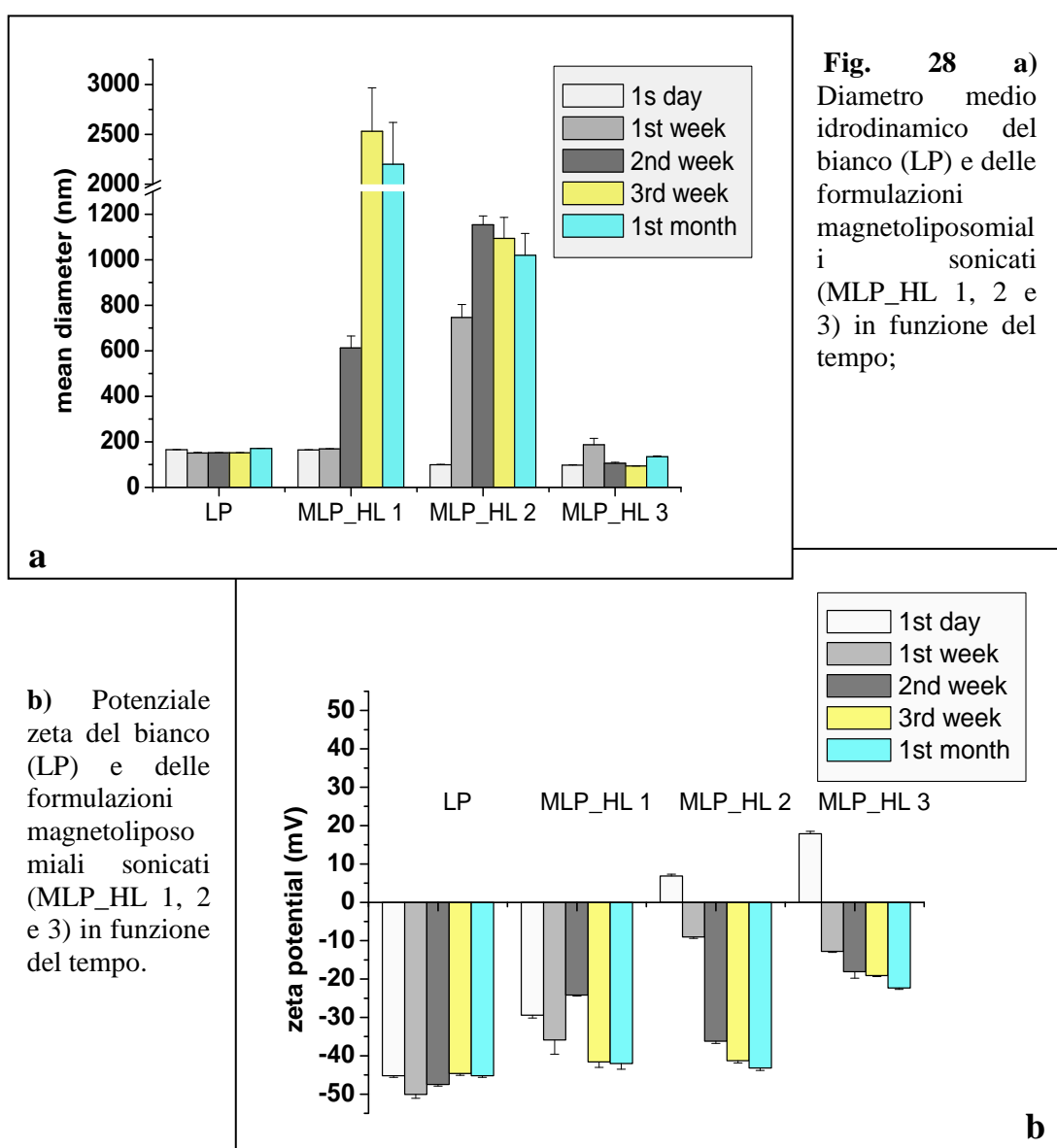
Il trattamento di sonicazione ha condotto al risultato desiderato, ovvero ad una considerevole riduzione del diametro idrodinamico medio delle strutture vescicolari (Figura 28 a), con un abbassamento notevole dell'indice di polidispersione, il quale, portandosi su valori minori o uguali a 0,3, indica l'ottenimento di un sistema quasi monodisperso (Tabella 9).

**Tabella 9**

	<b>1<sup>st</sup> day</b>	<b>1<sup>st</sup> week</b>	<b>2<sup>nd</sup> week</b>	<b>3<sup>rd</sup> week</b>	<b>1<sup>st</sup> month</b>
<b>LP</b>	0,29 ±0,02	0,24±0,01	0,25±0,01	0,26±0,01	0,30 ±0,02
<b>MLP_HL1</b>	0,22±0,01	0,23±0,01	0,62±0,04	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<b>MLP_HL 2</b>	0,17±0,03	0,58±0,05	0,70±0,03	0,69±0,08	0,75±0,07
<b>MLP_HL 3</b>	0,31±0,02	0,37±0,13	0,42±0,01	0,30±0,02	0,48±0,01

L'analisi nel tempo del diametro idrodinamico mostra una variazione considerevole nelle formulazioni MLP\_HL1 e MLP\_HL2, mentre rimane costante nella formulazione MLP\_HL3 mostrando una buona stabilità. Tale andamento può essere giustificato da un effetto stabilizzante delle nanoparticelle magnetiche adsorbite sulla superficie vescicolare che risulta

efficace, a partire dalla concentrazione presente nel campione MLP\_HL3, come già osservato da L.Zhang et al. (2005).<sup>20</sup> Nel grafico di Figura 28 b) dove sono riportati i valori di potenziale zeta, come già illustrato nel caso delle formulazioni non sonicate è possibile osservare un comportamento differente tra i campioni LP ed MLP\_HL1 e i restanti 2, MLP\_HL2 ed MLP\_HL3. Questa differenza è dovuta all'aumentato rapporto volumetrico ferrofluido/acqua bidistillata utilizzato per l'idratazione del film sottile dagli MLP\_HL1 verso gli MLP\_HL3 maggiormente evidente nei campioni sonicati. In particolare, il potenziale zeta degli MLP\_HL2 e 3 parte da valori positivi per poi spostarsi nel tempo verso valori negativi.





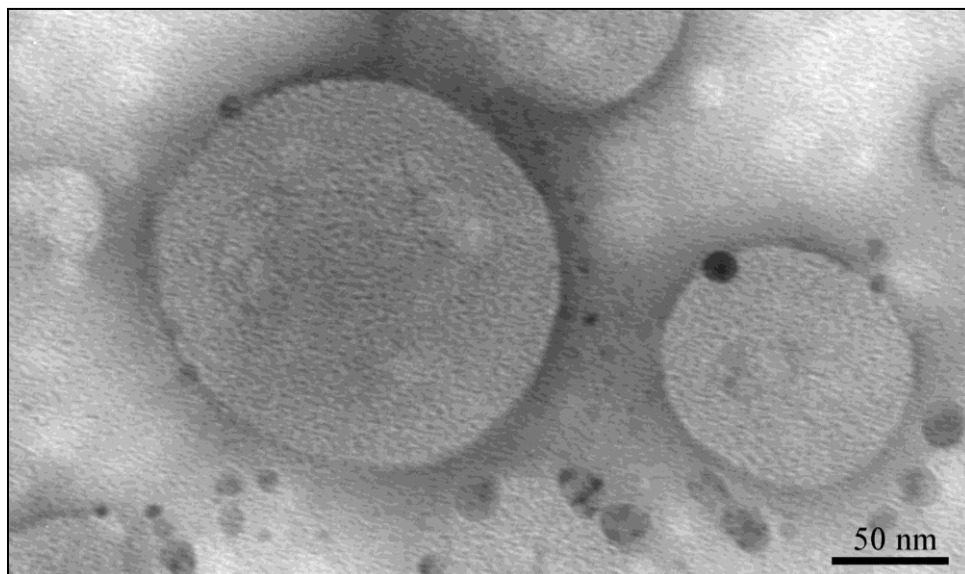
Il pH delle formulazioni vescicolari, sempre compreso tra 3 e 4, è risultato praticamente invariato rispetto a quello del ferrofluido di partenza.

L'esecuzione del saggio sulle dispersioni vescicolari e sui relativi campioni purificati ha permesso di valutare anche in questo caso l'Associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi, mettendo in luce dei valori molto elevati dopo purificazione, non solo per dialisi e gel cromatografia, ma anche per centrifugazione (Tabella 10).

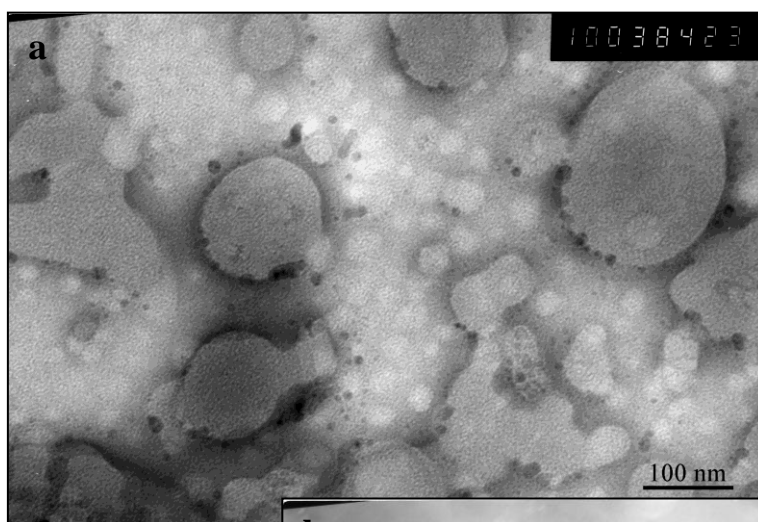
**Tabella 10**

<b>Campioni sonicati</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip. Dialisi</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip. Gel cromatografia</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip. Centrifugazione</b>
MLP_HL1	94,3	94,0	<i>n.d.</i>
MLP_HL2	96,7	93,5	91,3
MLP_HL3	96,2	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

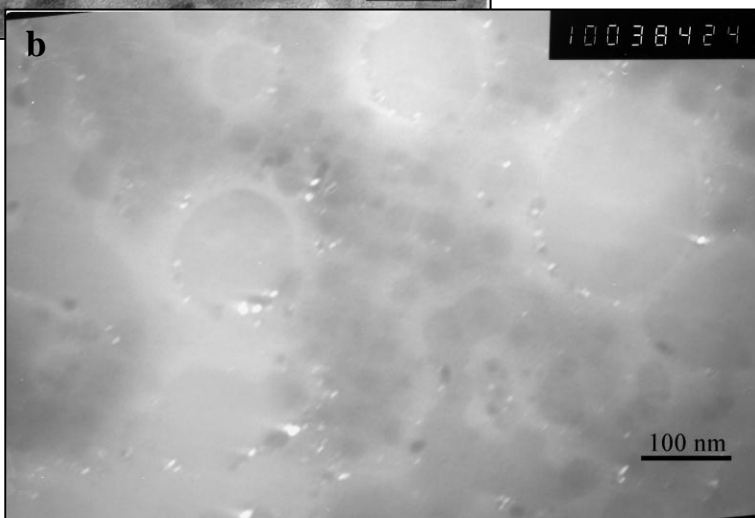
L'analisi TEM dei campioni MLP\_HL sonicati ha permesso di mettere in evidenza la medesima disposizione nanoparticellare già evidenziata in precedenza. Particolarmente interessante risulta essere il dettaglio su alcuni liposomi del campione MLP\_HL3 sonicato (Fig. 29). In questo caso non è facilmente visibile la struttura multilamellare. Inoltre, sempre al fine di mettere in evidenza l'effettiva corrispondenza tra le strutture scure nanoparticellari addossate ai liposomi e le HL\_SPION, sono state eseguite due foto dello stesso campo visivo in modalità Bright Field e Dark Field. Anche in questo caso si osserva la corrispondenza delle formazioni scure nanoparticellari con dei punti luminescenti, indice di materiale di natura cristallina, quale appunto la magnetite.



**Fig. 29** Immagine TEM di un campione MLP\_HL3 sonicato.



**Fig. 30 a)** Immagine TEM in modalità bright field di un campione MLP\_HL3 sonicato; **b)** immagine TEM in modalità dark field dello stesso campo visivo raffigurato in figura 28 a).



---

#### 2.3.3.2.2. Conclusioni

Il programma di lavoro eseguito ha permesso di mettere meglio in luce le caratteristiche chimico-fisiche dei colloidi ibridi magnetici derivanti dalle HL\_SPION. In particolare, l'analisi TEM ha confermato quanto già appurato nella **fase 1**, ovvero l'assenza di nanoparticelle nel core acquoso degli MLP\_HL, le quali invece si dispongono prevalentemente sulla superficie vescicolare esterna. Il trattamento di sonicazione si è mostrato utile ed efficace nel ridurre le dimensioni dei carrier vescicolari, mentre, un problema ancora irrisolto è risultato essere il pH della dispersione vescicolare, il quale, fortemente influenzato dal pH del ferrofluido di partenza, si è mantenuto su valori acidi.

#### 2.3.3.3. MLP\_HL – fase 3

La fase 2 sugli MLP\_HL ha permesso di mettere in luce l'efficacia della sonicazione, sull' omogeneità e sulla riduzione del diametro medio idrodinamico del sistema vescicolare ottenuto. Ciò nonostante si è cercato di variare i parametri di sonicazione, al fine di abbassare i valori di diametro medio idrodinamico ottenuti nella **fase 2**, a valori compresi tra i 100 e i 150 nm. Inoltre, dato il pH acido delle dispersioni vescicolari ottenute per idratazione del film sottile con la miscela ferrofluido/acqua bidistillata, è stato ritenuto opportuno sostituire l'acqua con un tampone fosfato, per aumentare il pH verso valori fisiologici. Poichè le concentrazioni di magnetite impiegate nelle formulazioni MLP\_HL1 ed MLP\_HL2 sono molto differenti, si è deciso di integrare tale stacco con un'ulteriore formulazione di concentrazione intermedia, denominata MLP\_HL1\*. Inoltre, considerato che i valori di Associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi delle 3 formulazioni valutate nella **fase 2** sono **risultati molto simili**, si è pensato di utilizzare anche una concentrazione di magnetite superiore alle precedenti, preparando la formulazione MLP\_HL4. Per concludere, data la disomogeneità, l'instabilità nel tempo e la minore associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi dei campioni non sonicati, studiati nella **fase 2**, in questa fase si è stabilito di caratterizzarli unicamente con l'analisi DLLS alle 24 h, concentrando invece maggiore attenzione sulle formulazioni sonicate.

---

### 2.3.3.3.1. Caratterizzazione MLP\_HL 1,1\*,2,3,4 - miscela ferrofluido/tampone fosfato

Le formulazioni MLP\_HL 1, 1\*, 2, 3, e 4 sono state preparate idratando il film sottile con una miscela di ferrofluido e tampone fosfato a pH7, tale da raggiungere la concentrazione lipidica finale di 20 mmol L<sup>-1</sup> e la concentrazione finale in magnetite prestabilita.

Nella tabella 11 sono riportate le formulazioni preparate.

**Tabella 11**

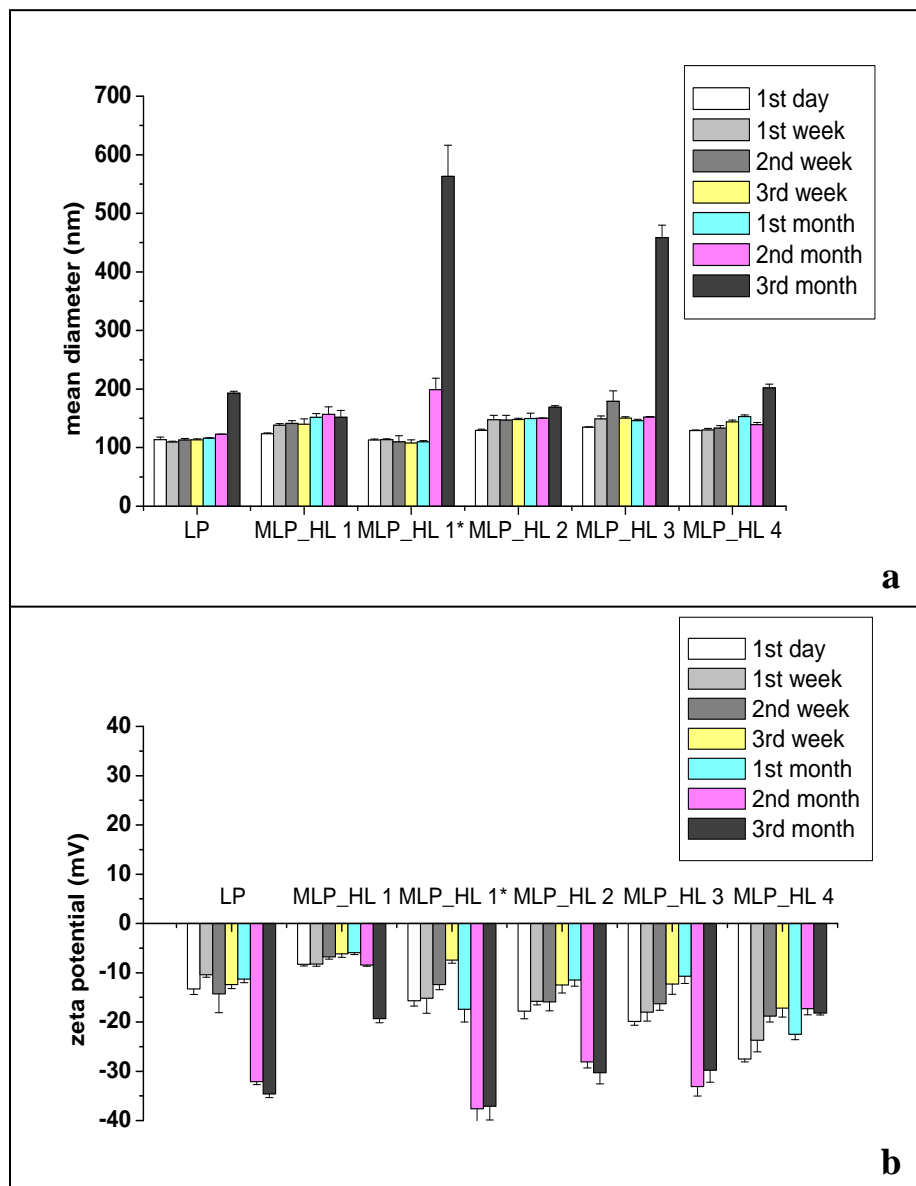
Formulazione	Conc. lipidica mmol/L	Conc. HL_SPION mmol/L	Conc. in HL_SPION mg/ml
MLP_HL 1	20	0,17	0,04
MLP_HL 1*	20	0,43	0,1
MLP_HL 2	20	0,86	0,2
MLP_HL 3	20	1,51	0,35
MLP_HL 4	20	2,80	0,65

Tutte le formulazioni sono sonicate applicando 10 cicli (invece che 5, come nella **fase 2**) della durata di 30 secondi, intervallati da 30 secondi di pausa, con Amplitude uguale a 13.

Inoltre, tutte le formulazioni sonicate sono state sottoposte ad analisi DLLS e del potenziale zeta al giorno 1, alla 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> settimana e al 2° e 3° mese. Le formulazioni, durante questo periodo, sono state conservate in frigorifero alla temperatura di 4°C e prima di ogni analisi sono state lasciate stemperare sino a temperatura ambiente, quindi agitate con un breve trattamento al vortex.

Come è possibile osservare dal grafico relativo al diametro medio idrodinamico delle formulazioni in funzione del tempo (Fig. 31 a), le dimensioni di partenza dei carrier vescicolari sonicati sono notevolmente inferiori rispetto a quelle delle formulazioni sonicate in **fase 2**. Ciò sottolinea l'effetto positivo della modifica sui parametri di sonicazione. L'analisi nel tempo mette in evidenza una buona stabilità sino al 2°/3° mese, di gran lunga superiore quindi a quella verificata per le formulazioni preparate in **fase 2**; ciò può dipendere sia dalla differenza delle dimensioni di partenza, che riducono la tendenza delle vescicole alla fusione, sia

dalla variazione della miscela idratante, non più ferrofluido/acqua ma ferrofluido/tampone.



**Fig. 31 a)** Diametro medio idrodinamico del bianco (LP) e delle formulazioni magnetoliposomiali sonicati (MLP\_HL 1, 1\*, 2, 3 e 4) in funzione del tempo; **b)** potenziale zeta del bianco (LP) e delle formulazioni magnetoliposomiali sonicati (MLP\_HL 1, 1\*, 2, 3 e 4) in funzione del tempo.

Per quanto riguarda il potenziale zeta, osservando il grafico di Figura 31 b), è possibile mettere in evidenza il fatto che, a differenza di quanto valutato nella **fase 2**, il potenziale di partenza delle formulazioni, all'aumentare del volume di ferrofluido impiegato, non si avvicina alla neutralità (vedi campioni MLP\_HL

2,3 non sonicati **fase 2**) o a valori positivi (vedi campioni MLP\_HL2,3 sonicati **fase 2**), ma tende verso valori sempre più negativi, dalla formulazione MLP\_HL1 verso la formulazione MLP\_HL4. Ciò può dipendere dal potenziale delle nanoparticelle HL\_SPION poste a contatto con il tampone fosfato, che, come illustrato nel sottoparagrafo 2.3.1.1. risulta nettamente opposto (negativo) rispetto a quello di partenza (positivo). Dato il posizionamento superficiale delle nanoparticelle, il potenziale delle vescicole sembra risentire del potenziale zeta nanoparticellare in maniera proporzionale alla concentrazione delle stesse in dispersione. Il pH delle formulazioni è risultato pari a 7, sia a 24 h dalla preparazione che nel tempo. L'indice di polidispersione, come riportato in tabella 12, ha presentato valori compresi tra 0,3 e 0,5, ed ha mostrato una buona stabilità sino al 3° mese, in accordo con quanto rilevato per il diametro medio idrodinamico nel tempo.

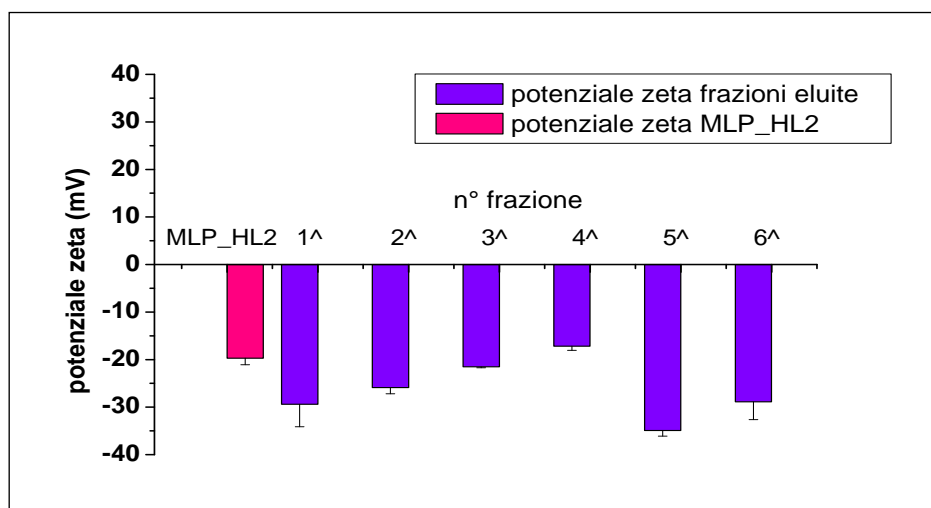
**Tabella 12**

	1 <sup>st</sup> day	1 <sup>st</sup> month	2 <sup>nd</sup> month	3 <sup>rd</sup> month
<b>LP</b>	0,26±0,01	0,33±0,04	0,26±0,01	0,05±0,02
<b>MLP_HL1</b>	0,27±0,01	0,46±0,05	0,42±0,04	0,45±0,07
<b>MLP_HL 1*</b>	0,47±0,06	0,34±0,03	0,44±0,09	0,62±0,06
<b>MLP_HL 2</b>	0,38±0,02	0,41±0,03	0,46±0,07	0,47±0,07
<b>MLP_HL 3</b>	0,39±0,01	0,42±0,07	0,46±0,05	0,96±0,03
<b>MLP_HL 4</b>	0,40±0,02	0,46±0,02	0,43±0,05	0,35±0,08

Nella **fase 3** è stata del tutto esclusa, come metodica di purificazione, la centrifugazione, in quanto i valori di associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi calcolati nelle precedenti **fasi** per dialisi e gel cromatografia sono risultati sufficientemente precisi nonostante l'elevata diversità tra le due.

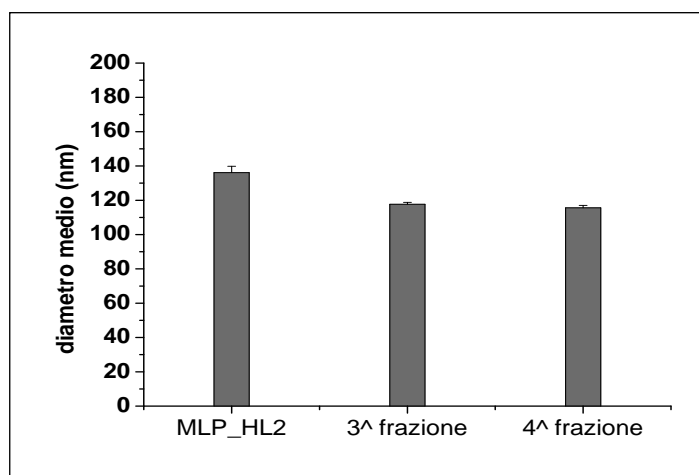
Prima di riportare i risultati relativi all'associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi viene di seguito riportato un breve studio di approfondimento sulla gel cromatografia svolto sul campione MLP\_HL2. In particolare, in ogni frazione eluita dalla colonna è stato misurato il potenziale zeta in modo da mettere in relazione la

presenza effettiva del campione nelle frazioni (visibile per la marcata opalescenza) con la variazione del suddetto parametro. La sola fase mobile eluita dalla colonna, precedentemente al caricamento del campione, ha mostrato un potenziale zeta pari a -30 mV, ovvero un potenziale in partenza più negativo rispetto a quello del campione analizzato. Questo dato ha permesso di correlare la variazione del potenziale, all'eluizione delle vescicole. Infatti, come è possibile osservare dal grafico di figura 32, i campioni opalescenti, raccolti nella 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> frazione, hanno mostrato dei valori di potenziale molto simili al campione originale sottoposto alla gel cromatografia, (circa -15/-20 mV); mentre, nel caso delle frazioni precedenti e successive alla raccolta del campione (frazioni 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup>) il potenziale si è mantenuto su valori più negativi.



**Fig.32** Potenziale zeta della formulazione MLP\_HL2 sottoposta a gel cromatografia e delle relative frazioni eluite dalla colonna; presenza del campione magnetoliposomiale in corrispondenza della 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> frazione.

Al fine di confermare l'effettiva presenza dei magnetoliposomi nelle frazioni 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup>, queste sono state sottoposte ad analisi DLLS, mostrando delle dimensioni paragonabili al campione magnetoliposomiale di partenza, come mostrato nel grafico di Figura 33.



**Fig. 33** Diametro medio idrodinamico del campione MLP\_HL2 e delle 2 frazioni opalescenti eluite dalla colonna.

Come è possibile osservare dalla Tabella 13, l'associazione %  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -liposomi valutata per dialisi sembra leggermente decrescere all'aumentare della concentrazione di magnetite applicata, dalla 1^a verso la 5^a formulazione.

**Tabella 13**

Campioni sonicati	Assoc. % $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -lip. Dialisi	Assoc. % $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -lip Gel cromatografia
MLP_HL1	91,0	81,5
MLP_HL1*	92,8	85,2
MLP_HL2	79,6	72,4
MLP_HL3	77,2	74,9
MLP_HL4	74,2	77,0

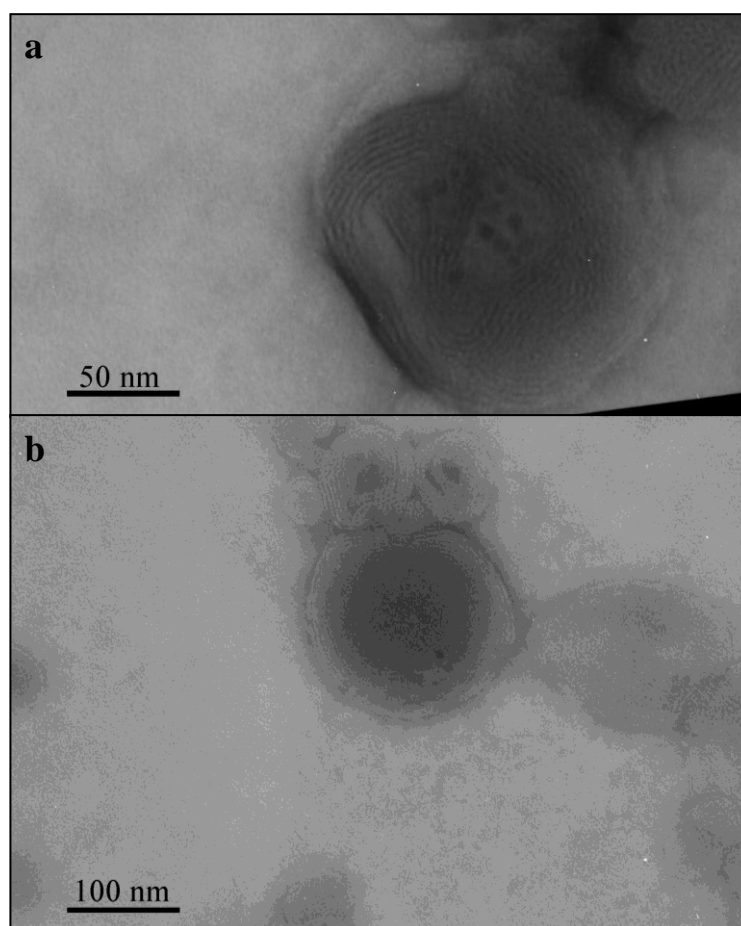
Mentre, per quanto riguarda l'associazione %  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -liposomi valutata per gel cromatografia, è sempre presente una leggera flessione negativa che però si mantiene su valori stabili nelle 3 formulazioni a concentrazione maggiore.

Complessivamente, i valori di associazione % si mantengono relativamente alti (>70%) e sottolineano nel complesso una capacità di caricamento, in relazione al rapporto moli magnetite/moli P90, positiva e crescente all'aumentare della concentrazione di magnetite applicata.



---

L'analisi TEM dei campioni MLP\_HL ottenuti per idratazione con la miscela ferrofluido/tampone non ha messo in luce particolari variazioni morfologiche dei carriers ibridi magnetici, che risultano nella maggior parte dei casi, circondati esternamente dalle nanoparticelle. Diversamente dalle fasi precedenti però, in questa sessione sperimentale si sono osservati in qualche caso nanoparticelle accolte nel core acquoso o comunque visualizzate in corrispondenza di esso, come mostrato nelle Figura 34 a) e b). Tale evento potrebbe essere correlato al cambio netto del potenziale delle HL\_SPION poste a contatto con il tampone fosfato. Uno studio futuro maggiormente articolato e approfondito finalizzato a mettere in luce l'influenza, oltre che della stabilizzazione superficiale delle nanoparticelle, del pH del mezzo e del potenziale zeta sull' inclusione nel core acquoso liposomiale sarebbe auspicabile.



**Fig. 34 a), b)** Immagini TEM di alcuni sporadici casi di inclusione delle HL\_SPION nel core acquoso liposomiale.

Infine, per valutare la possibilità di conservare i campioni liposomiali a lungo termine, è stata eseguita una prova di liofilizzazione sui campioni MLP\_HL2 e 3 aggiungendo quantità crescenti di trialosio come crioprotettore.

Nella tabella seguente vengono riportati i dati DLLS dei campioni prima e dopo liofilizzazione, per ridispersione in un volume di tampone uguale a quello di partenza.

**Tabella 14**

	PRE LIOFILIZ.	POST LIOFILIZ. 1 mg/mg P90*	POST LIOFILIZ. 1,5 mg/mg P90*	POST LIOFILIZ. 2 mg/mg P90*
LP	100,1	140,9	102,4	108,1
MLP_HL2	127,5	209	139,4	133,4
MLP_HL3	123,3	215,4	175,9	153,4

\*mg di trialosio per mg P90

Come è possibile osservare dai risultati ottenuti, l'aggiunta di 2 mg di trialosio per mg di P90 utilizzato è sufficiente a mantenere costanti le dimensioni del campione di partenza.

#### 2.3.3.3.2. Conclusioni

Nella **fase 3** sono stati modificati diversi parametri formulativi (per es. l'aumento dei cicli di sonicazione o la sostituzione dell'acqua con il tampone fosfato), che hanno permesso di superare dei punti potenzialmente critici dei sistemi vescicolari magnetici. E' importante ricordare che un pH fisiologico è determinante al fine di consentire alla formulazione di venire a contatto con i fluidi biologici e con le cellule senza indurre citotossicità. Le dimensioni dei carrier vescicolari sono anch'esse molto importanti al fine di consentire l'immissione del carrier magnetico nel torrente circolatorio e per poter usufruire del targeting passivo verso i siti tumorali, per mezzo dell'effetto EPR. Rimane l'interrogativo sulla stabilità delle nanoparticelle sulla superficie vescicolare e quindi sulla concreta possibilità di applicare il carrier magnetico attraverso lo sfruttamento di un targeting fisico. Ad ogni modo, ipotizzando una discreta stabilità del sistema MLP\_HL, la disponibilità di un core acquoso

---

completamente libero potrebbe garantire un efficiente trasporto di farmaci idrofili verso il sito target.

Sono sicuramente presenti ancora molti aspetti non sufficientemente chiari sui sistemi vescicolari creati con le HL\_SPION, i quali potrebbero essere oggetto di studi futuri. Tra questi risulta importante verificare la stabilità delle nanoparticelle sulla superficie vescicolare, il tipo di interazione fosfolipidi-nanoparticella, il grado di magnetizzazione degli MLP\_HL. Inoltre, un altro importante studio potrebbe essere quello di utilizzare magnetite di natura idrofila ricoperta con citrato (preparata sempre mediante la metodica di Massart), al fine di confermare il posizionamento di queste, già mostrato in precedenti studi, nel core acquoso, e paragonarlo con le HL\_SPION. Tale raffronto permetterebbe di aprire una discussione sull'importanza del pH del ferrofluido e della dispersione liposomiale ottenuta, nonché della stabilizzazione superficiale delle nanoparticelle, sul tipo di posizionamento del nanocolloide magnetico nella struttura vescicolare.

---

#### 2.3.3.4. *Analisi MLP\_HB – fase I*

Lo studio sulle HB\_SPION e sui relativi sistemi vescicolari magnetici è stato svolto sulla base di alcune considerazioni:

La prima è stata che, avendo già verificato il posizionamento prevalentemente esterno alla struttura vescicolare delle HL\_SPION, si voleva verificare che tipo di posizionamento assumessero le nanoparticelle stabilizzate in mezzo idrofobico; la seconda, invece, è stata che, considerando l'elevata capacità di caricamento dei liposomi nei confronti delle sostanze idrofobiche, sembrerebbe potenzialmente efficace coinvolgere nanoparticelle magnetiche di natura apolare per la generazione di magnetoliposomi. In ultimo, la quasi totale assenza di lavori in letteratura riguardanti nanoparticelle magnetiche di natura idrofobica, ha stimolato la curiosità di andare ad indagare su questo tipo di nanocolloidi e sui relativi carrier magnetici derivanti, ancora del tutto inesplorati.

##### 2.3.3.4.1. *Caratterizzazione MLP\_HB<sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></sub>*

Le prime formulazioni liposomiali con le HB\_SPION sono state preparate utilizzando le nanoparticelle disperse in esano. Tale approccio iniziale ha determinato numerosi inconvenienti, legati in particolare al solvente in cui le nanoparticelle si trovano disperse. L'esano infatti andava regolarmente incontro ad una rapida evaporazione (1-2 gg), (nonostante l'utilizzo di vial di vetro classiche, sigillate con tappo di plastica e parafilm) determinando la continua variazione della concentrazione in magnetite nel ferrofluido apolare e, talvolta, la perdita totale del mezzo disperdente. Non essendo possibile né conoscere in partenza il titolo in magnetite del ferrofluido apolare, nè avere a disposizione volta per volta ferrofluidi esattamente identici e non riuscendo a mantenere costante il volume del ferrofluido, si è proceduto alla preparazione delle formulazioni, impiegando un determinato volume di ferrofluido, e analizzando il contenuto in magnetite direttamente nelle dispersioni vescicolari ottenute. Il film sottile è stato idratato con acqua bidistillata e le formulazioni sono state sottoposte ad un processo di sonicazione secondo i seguenti parametri: 5 cicli di 30 secondi intervallati da 30 secondi di pausa, Amplitude 13.

Nella tabella sottostante (Tab. 15) si riportano la media dei valori del diametro medio idrodinamico, dell'indice di polidispersione, del potenziale zeta e del contenuto in magnetite ottenuto a partire da 3 formulazioni MLP\_HB<sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></sub> preparate in contemporanea, con l'impiego di un medesimo volume di ferrofluido.

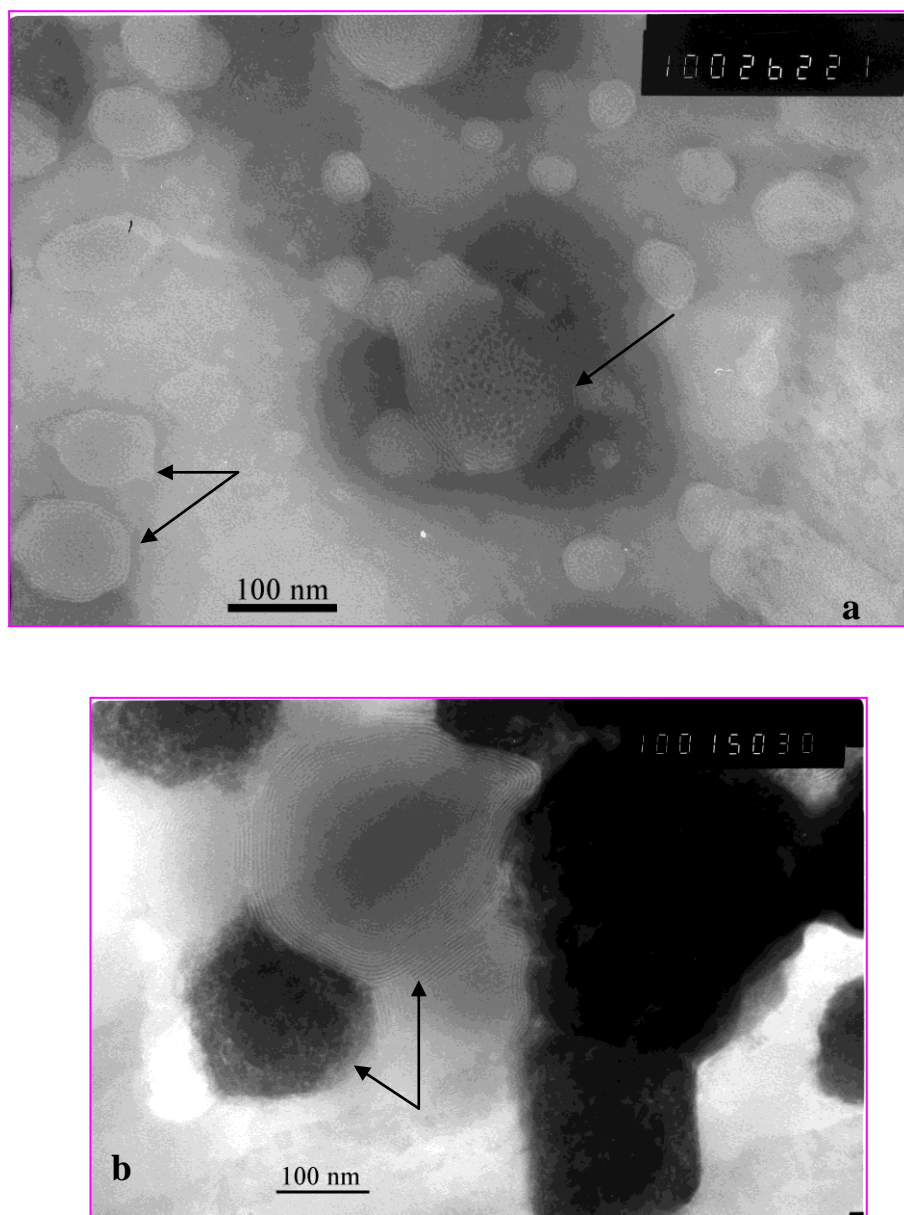
**Tabella 15**

<b>&lt;D&gt;<sub>DLLS</sub> (nm)<sup>1</sup></b>	<b>IP</b>	<b>Potenziale zeta (mV)</b>	<b>Concentrazione Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (mg/ml)</b>
281,0±10,7	0,4 ± 0,1	-44,5 ± 4,0	0,40±0,03

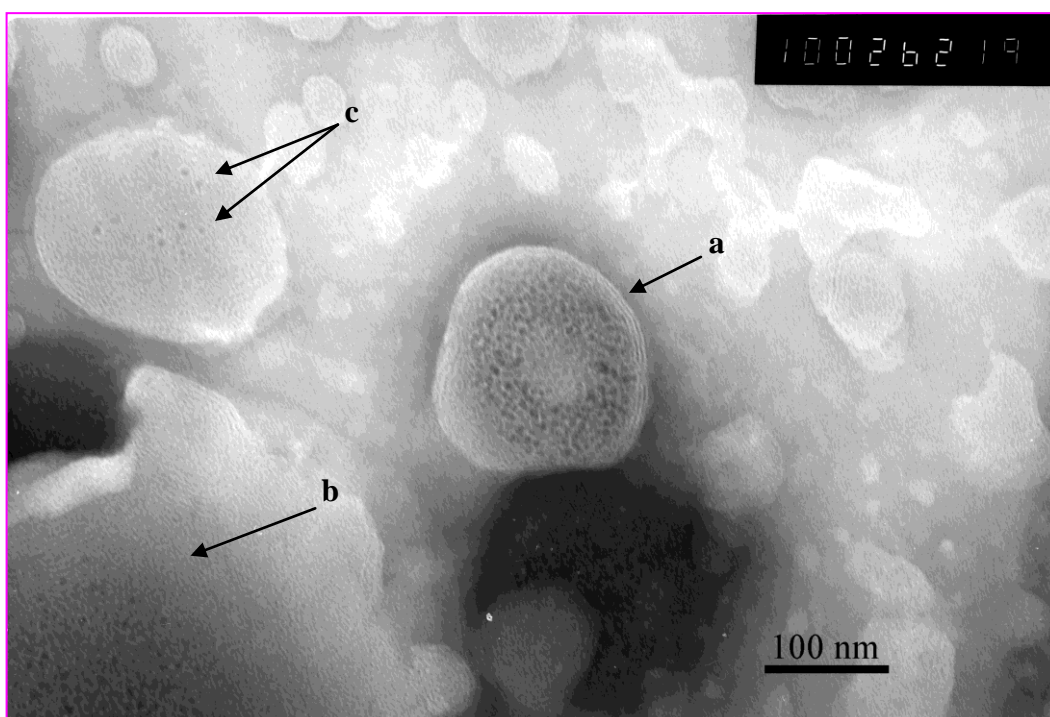
<sup>1</sup> <D><sub>DLLS</sub> (nm): diametro medio idrodinamico

I campioni ottenuti sono stati quindi sottoposti all'analisi al microscopio elettronico a trasmissione al fine di metterne in luce le principali caratteristiche morfologiche. Le foto TEM hanno mostrato la presenza di due principali tipi di strutture vescicolari, una del tutto priva di nanoparticelle, mentre l'altra ricolma di magnetite, come è possibile osservare nella Figura 35 a). Inoltre è stata rilevata la presenza di formazioni scure, di forma esagonale (o poligonale), probabilmente riconducibili ad aggregati nanoparticellari, come mostrato nella Figura 35 b).

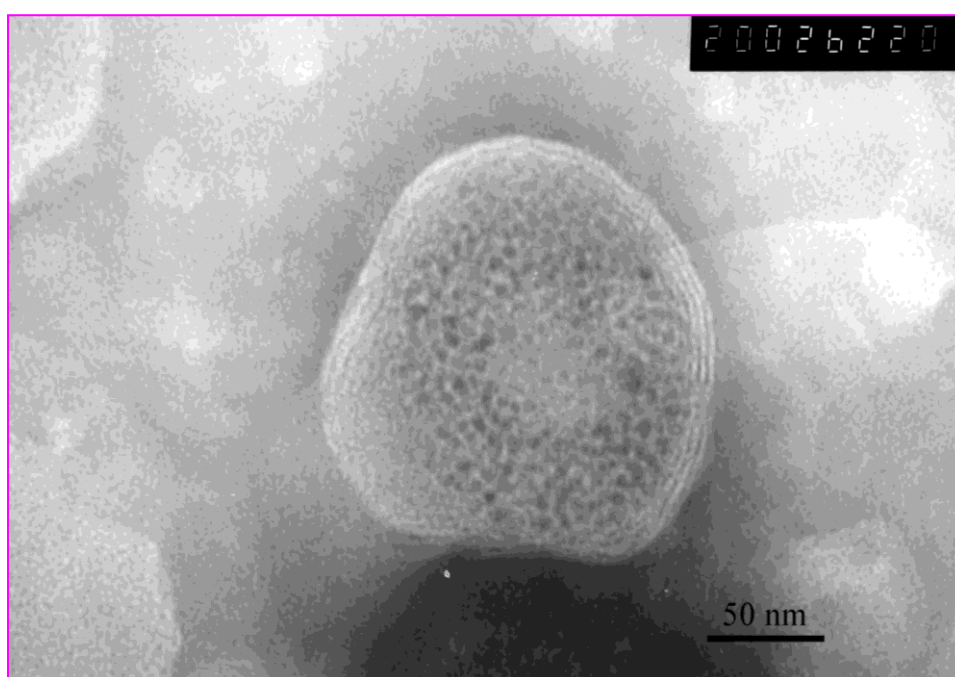
Le strutture maggiormente interessanti sono risultate le vescicole ripiene di magnetite, sulle quali sono state eseguite una serie di foto di approfondimento (figg. 36-39). Nella Foto 36 è possibile osservare la presenza di un magnetoliposoma centrale (indicato con **a**), caratterizzato da un nucleo denso di nanoparticelle magnetiche, completamente circondato da bilayers fosfolipidici. Tale struttura, prendendo come riferimento un liposoma classico, farebbe pensare ad un magnetoliposoma ricolmo, nel proprio core acquoso, di nanoparticelle magnetiche. In realtà, tale ipotesi è stata presto scartata in quanto in disaccordo con le caratteristiche intrinseche delle HB\_SPION.



**Fig. 35** **a)** Immagine TEM di un campione MLP\_HBC<sub>6</sub>H<sub>14</sub> riportante sia strutture vescicolari vuote che una struttura vescicolare ripiena al centro; **b)** immagine TEM di un campione MLP\_HBC<sub>6</sub>H<sub>14</sub> riportante sia strutture vescicolari vuote che particolari formazioni scure di forma poligonale.

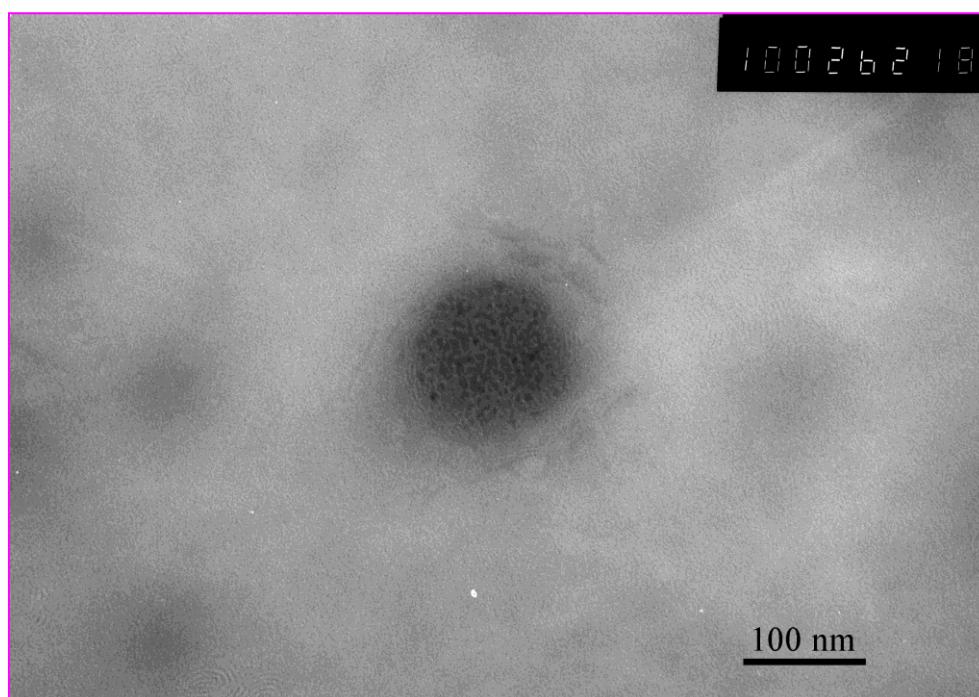


**Fig. 36** Immagine TEM di un campione MLP\_HBC<sub>6</sub>H<sub>14</sub> con raffigurazione di: **a)** un magnetoliposoma con nucleo centrale denso di nanoparticelle magnetiche, completamente circondato da bilayers fosfolipidici, **b)** una formazione vescicolare di forma irregolare determinata, anche in questo caso, da lamelle fosfolipidiche direttamente addossate su un aggregato di nanoparticelle magnetiche, **c)** un sistema vescicolare caratterizzato da nanoparticelle magnetiche inserite all'interno di bilayers fosfolipidici.



**Fig. 37** Ingrandimento della configurazione **a)** indicata in figura 36.





**Fig. 38** Immagine TEM di un campione MLP\_HBC<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.

In particolare, sono state formulate 3 ipotesi capaci di giustificare la configurazione riportata nelle figure 36 a), 37 e 38:

1) La prima ipotesi è che le HB\_SPION, di natura apolare, vengano accolte nel doppio strato fosfolipidico e che, quindi, una tale configurazione sia legata alla successione dei bilayers sino alle parti più profonde della vescicola. Seppure tale ipotesi possa lasciare qualche dubbio riguardo la configurazione visibile nelle figg. 36 (a), 37 e 38, risulta essere comunque abbastanza rappresentativa della configurazione c) di Fig. 36, in cui le HB\_SPION sono chiaramente inserite nei bilayers.

2) La seconda ipotesi è invece che le HB\_SPION, al momento dell'idratazione del film sottile, formino un aggregato nanoparticellare, per assumere una conformazione più stabile in un mezzo polare (acqua o tampone), e che, di seguito, tali aggregati vengano ulteriormente stabilizzati dai fosfolipidi presenti in dispersione. Gli aggregati nanoparticellari, infatti, esponendo esternamente le catene idrofobiche dell'acido oleico, determinerebbero la disposizione di un primo monolayer di fosfolipidi, in maniera tale che le code apolari siano rivolte verso le code idrofobiche dell'acido oleico e le teste polari verso l'ambiente

---



---

acquoso circostante. La struttura oligolamellare dei carrier magnetici ottenuti sarebbe poi giustificata dalla successione di bilayers fosfolipidici al di sopra del primo monolayer stabilizzante l'aggregato.

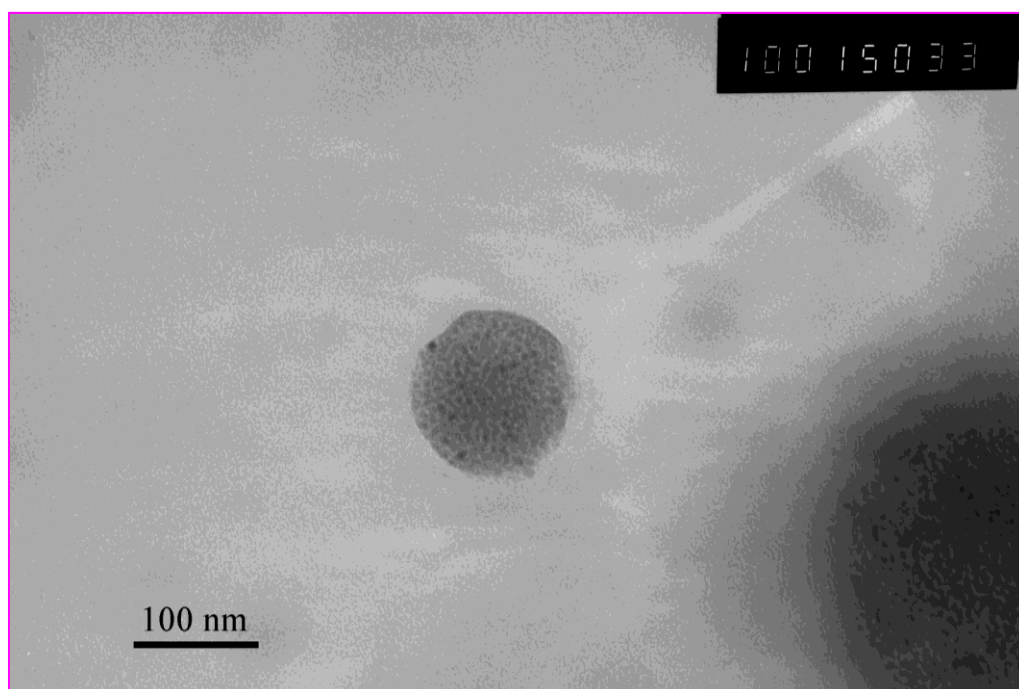
3) La terza ipotesi invece è stata fatta soprattutto sulla base degli studi svolti da De Cupyer, il quale, nel suo primo lavoro,<sup>14</sup> ha dimostrato che le molecole di acido laurico, adsorbite sulla superficie delle nanoparticelle magnetiche da lui utilizzate, venivano sostituite con molecole fosfolipidiche, ottenendo dei magnetoliposomi privi di core acquoso, caratterizzati da una nanoparticella magnetica su cui vi è adagiato un bilayer fosfolipidico. E' possibile che un simile processo avvenga anche nel caso dei nostri aggregati nanoparticellari, che potrebbero perdere l'acido oleico, esposto esternamente all'aggregato, che verrebbe sostituito dai fosfolipidi. In questo caso a contatto con le nanoparticelle non si avrebbe la formazione di un monolayer, come esposto nell'ipotesi 2, ma di un bilayer, come riportato nel lavoro di De Cupyer.<sup>14</sup> Nel suddetto lavoro, però, non si fa esplicito riferimento al tipo di interazione esistente tra l'acido laurico e le nanoparticelle magnetiche, in quanto pur parlando di adsorbimento, non viene indicato chiaramente se questo sia di tipo fisico o chimico. Se si trattasse di un adsorbimento di tipo fisico, il fenomeno di sostituzione dell'acido laurico con le molecole fosfolipidiche potrebbe anche avvenire per semplice contatto.

Nel nostro caso una simile sostituzione non sarebbe invece facilmente giustificabile, sebbene da noi non sia stata sperimentalmente verificata, in quanto le HB\_SPION presentano un legame covalente dentato tra il carbossilato dell'acido oleico ed il Ferro (III) della magnetite (legame opportunamente verificato mediante indagine ai raggi X), ben più forte rispetto ad un'interazione di tipo fisico, basato su delle deboli Forze di Van der Waals.

Considerati gli interrogativi relativi al possibile raffronto tra il fenomeno descritto da De Cupyer e quello a carico dei nostri MLP\_HB, sono state considerate maggiormente attendibili le ipotesi 1 e 2. Ciò nonostante, tutte e 3 le ipotesi avvallano la configurazione del magnetoliposoma privo del core acquoso. Inoltre, a sostegno del fatto che le HB\_SPION non vadano incontro alla perdita delle catene di acido oleico, c'è un'ulteriore considerazione, relativa al fatto

---

che, osservando in dettaglio le foto 37-38, le HB\_SPION dell'agglomerato presentano una distanza l'una dall'altra sempre uguale e molto simile a quella rilevata al TEM per analisi delle sole HB\_SPION. Questa osservazione rafforza l'ipotesi che la distanza tra le nanoparticelle sia effettivamente legata all'ingombro sterico dell'acido oleico, ancora presente sulla nanoparticella. Nella foto di Figura 39 anche se il nucleo concentrato di nanoparticelle sembra non essere circondato da lamelle fosfolipidiche, come invece è osservato nelle foto precedenti, la forma pressochè circolare e i margini sfumati rimandano comunque ad una struttura caratterizzata da un nucleo di nanoparticelle circondato da materiale fosfolipidico, benchè poi non organizzato in molteplici lamelle concentriche.

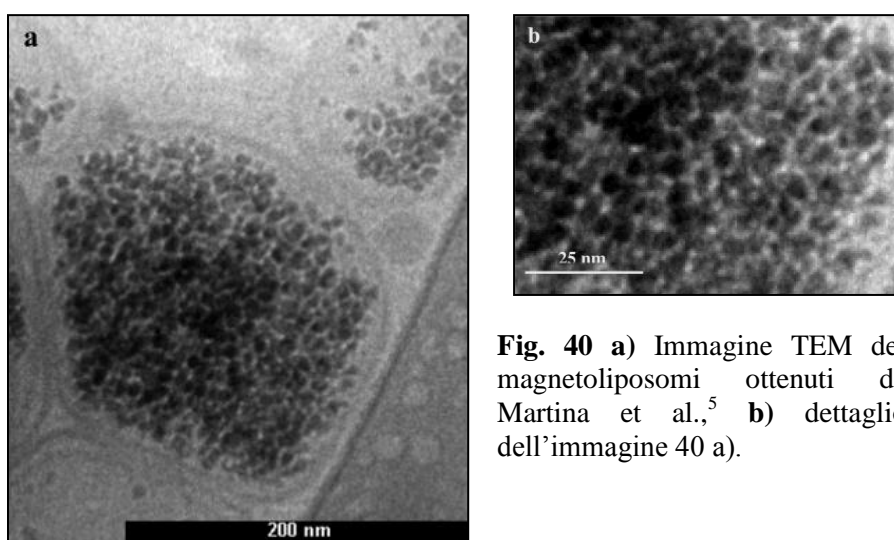


**Fig. 39** Immagine TEM di un campione MLP\_HBC<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.

E' risultato interessante verificare una certa somiglianza tra gli MLP\_HBC<sub>6</sub>H<sub>14</sub> e i magnetoliposomi ottenuti da Martina et al. (2005),<sup>5</sup> raffigurati in Fig.40 a) e b), i quali però, a differenza dei nostri, sono stati ottenuti a partire da nanoparticelle di maghemite Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, derivanti da nanocristalli di Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sintetizzati con il metodo di Massart (la stessa metodica di sintesi utilizzata per la preparazione delle nostre HL\_SPION), circondate, in questo caso, da citrato e quindi disperse

in acqua. Gli autori sostengono che la distanza tra una nanoparticella e l'altra sia legata alla presenza di un sottile strato acquoso e che le nanoparticelle non solo non si aggregano tra loro, ma neppure instaurano alcun tipo di interazione con il bilayer fosfolipidico.

Al contrario, nel caso degli  $MLP\_HB_{C_6H_{14}}$ , il rapporto con i fosfolipidi risulta essere determinante, in quanto, dato l'elevato carattere idrofobico delle  $HB\_SPION$ , i fosfolipidi rappresentano l'unico mezzo attraverso il quale le nanoparticelle possono andare disperse nel mezzo idrofilo. E' curioso quindi osservare come la conoscenza dei materiali di partenza utilizzati, in questo caso i due tipi di magnetite diversamente stabilizzate, possa modificare completamente l'interpretazione di immagini TEM apparentemente molto simili.



**Fig. 40** a) Immagine TEM dei magnetoliposomi ottenuti da Martina et al.,<sup>5</sup> b) dettaglio dell'immagine 40 a).

#### 2.3.3.4.2. Conclusioni

L'analisi TEM ha permesso di mettere in evidenza delle strutture ibride magnetiche dotate di un'elevata potenzialità. In particolare, i magnetoliposomi ottenuti risultano essere fra i primi carrier vescicolari magnetici, preparati a partire da magnetite preformata di natura idrofobica, caratterizzati da un nucleo denso di nanoparticelle abbinato ad una struttura oligolamellare.

Tale analisi preliminare ha quindi motivato lo svolgimento di uno studio successivo maggiormente approfondito e mirato al superamento dei principali punti critici correlati all'uso delle  $HB\_SPION_{C_6H_{14}}$ .

---

#### 2.3.3.5. *Analisi MLP\_HB – fase 2*

Il principale punto critico delle HB\_SPION<sub>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></sub> è risultato la loro dispersione in esano, che ha comportato una serie di problematiche, relative soprattutto allo stoccaggio del ferrofluido apolare. Data quindi l'impossibilità, attraverso l'utilizzo del ferrofluido apolare, di impiegare una quantità di magnetite specifica e ripetibile nelle formulazioni liposomiali, si è preferito utilizzare le nanoparticelle idrofobiche allo stato secco, sintetizzate mediante la stessa procedura. Questo tipo di approccio ha permesso di quantificare la magnetite coinvolta nelle formulazioni per semplice pesata ed, inoltre, di preparare sistemi vescicolari magnetici paragonabili, seppur preparati a distanza di tempo l'uno dall'altro.

##### 2.3.3.5.1. *Caratterizzazione MLP\_HB*

Le formulazioni MLP\_HB sono state ottenute per idratazione del film sottile con tampone fosfato a pH 7 e sono state sottoposte ad un processo di sonicazione caratterizzato da 10 cicli di 30 secondi intervallati da 30 secondi di pausa. Sono state preparate sei formulazioni a concentrazione crescente in magnetite, aggiungendo una concentrazione pari a 1 mg/ml in magnetite (MLP\_HB5). Nella tabella 16 sono riportati i parametri specifici di ciascuna formulazione.

**Tabella 16**

Formulazione	Conc. lipidica mmol/L	Conc. HB_SPION mmol/L	Conc. HB_SPION mg/ml
MLP_HB 1	20	0,17	0,04
MLP_HB 1*	20	0,43	0,1
MLP_HB 2	20	0,86	0,2
MLP_HB 3	20	1,51	0,35
MLP_HB 4	20	2,80	0,65
MLP_HB 5	20	4,30	1,0

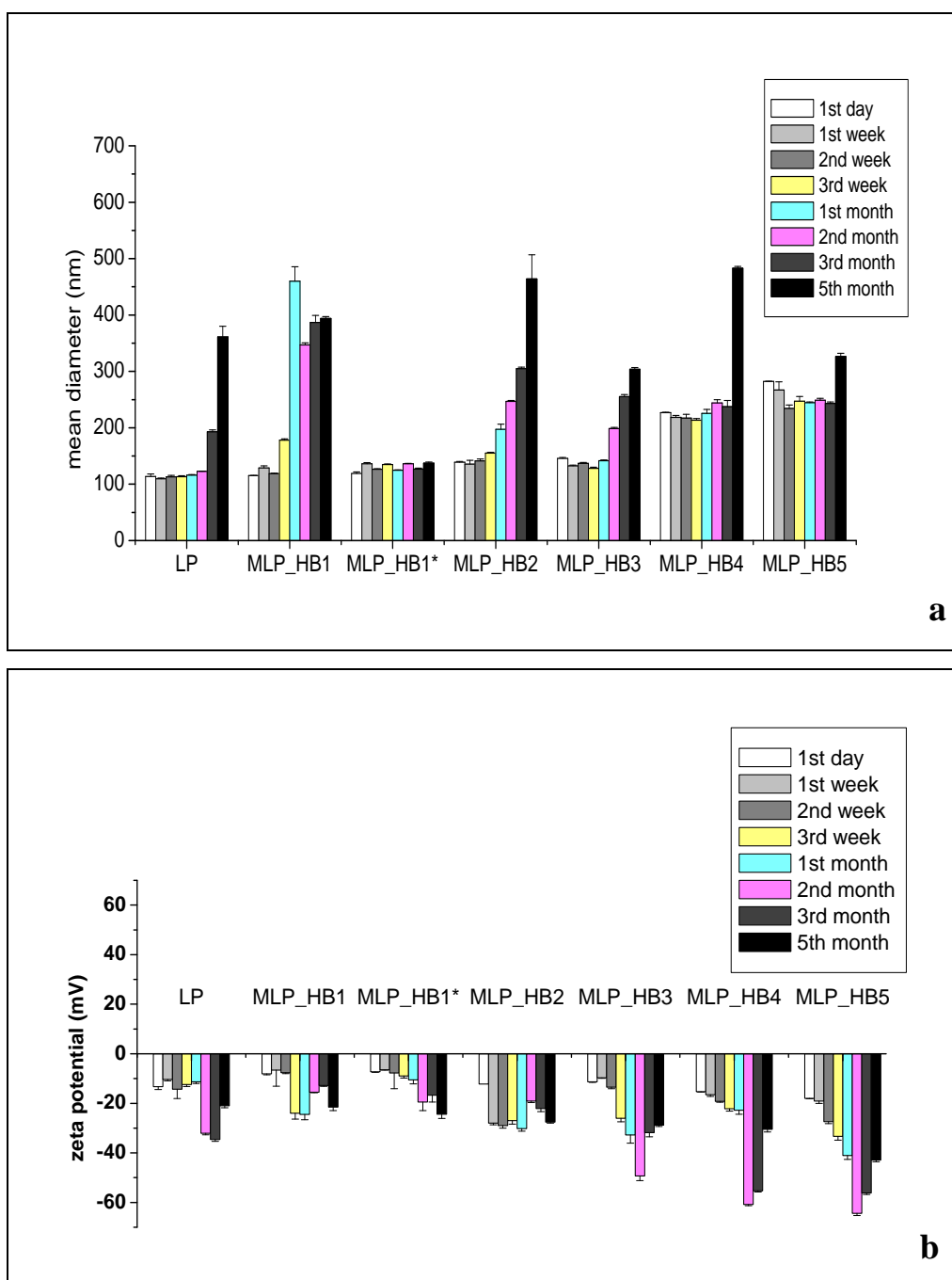
---

---

Osservando il grafico di figura 41 a) è possibile valutare la differenza di diametro iniziale tra le formulazioni MLP\_HB1, 2 e 3 e le MLP\_HB4 e 5; in particolare, in queste ultime due, il diametro risulta essere quasi doppio rispetto alle precedenti. Le maggiori dimensioni potrebbero essere giustificate dalla disposizione della magnetite. Negli MLP\_HB, questa è contenuta sottoforma di nucleo centrale denso, e quindi l'aumentata concentrazione impiegata potrebbe determinare la formazione di nuclei aggregati di più elevate dimensioni e quindi influire fortemente sul diametro medio idrodinamico della struttura vescicolare.

Tutte le formulazioni, ad eccezione della MLP\_HB1, mostrano una buona stabilità dimensionale per i primi 30 gg. Nelle settimane a seguire anche le formulazioni MLP\_HB2 e 3 mostrano un aumento del diametro medio idrodinamico, mentre le formulazioni ad elevata concentrazione mostrano dei valori stabili fino al 3° mese. Nonostante quanto appurato con le indagini DLLS, le formulazioni MLP\_HB4 e 5 con il trascorrere delle settimane hanno dato luogo alla formazione di visibili aggregati che, tuttavia, venendo a separarsi sul fondo della vial, non hanno impedito l'esecuzione delle misurazioni DLLS e neppure comportato l'alterazione della restante dispersione.

E' quindi importante sottolineare la ridotta stabilità delle formulazioni ad elevata concentrazione in magnetite, soprattutto una volta trascorso il primo mese dalla preparazione. Il grafico di Figura 41 b) mostra come il potenziale zeta, per tutte le formulazioni, parta da valori paragonabili e tenda verso valori maggiormente negativi con il passare del tempo; in particolare, tale calo si verifica tra la 1<sup>a</sup> e la 3<sup>a</sup> settimana, nel caso delle formulazioni MLP\_HB2 ed MLP\_HB1, mentre a partire soprattutto dal 2° mese per tutte le altre. L'abbassamento del potenziale risulta maggiormente evidente nelle formulazioni ad elevato contenuto in magnetite.



**Fig. 41** a) Diametro medio idrodinamico delle formulazioni MLP\_HB in funzione del tempo; b) potenziale zeta delle formulaizioni MLP\_HB in funzione del tempo.

Per quanto riguarda l'indice di polidispersione delle formulazioni MLP\_HB, è possibile osservare dalla Tabella 17 come esso aumenti all'aumentare del contenuto in magnetite e rimanga generalmente stabile sino al 3° mese.

**Tabella 17**

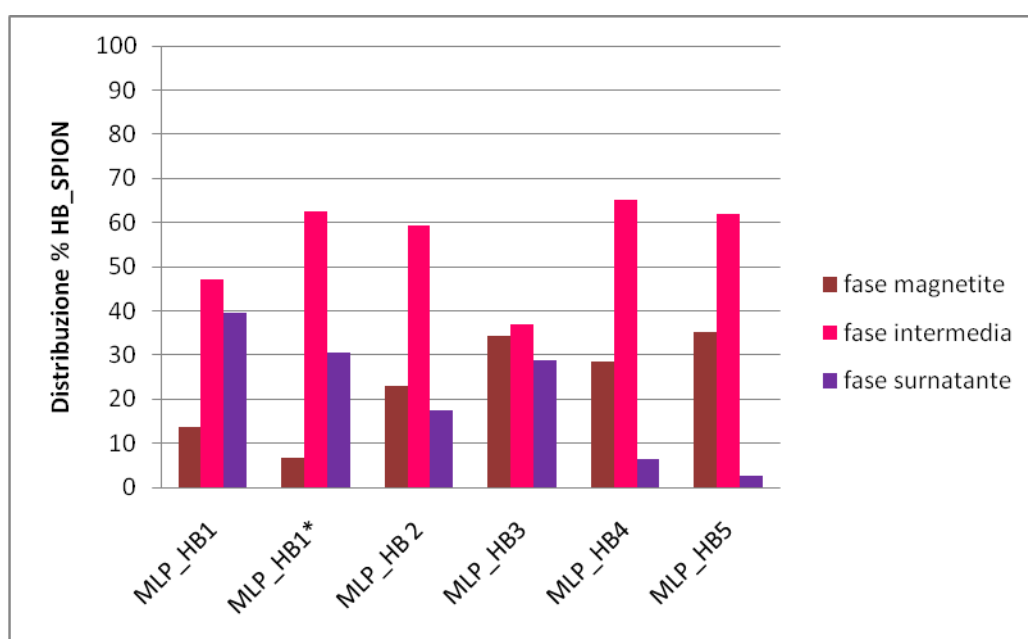
	1 <sup>st</sup> day	1 <sup>st</sup> month	3 <sup>rd</sup> month	5 <sup>th</sup> month
<b>LP</b>	0,26 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,44 ± 0,01
<b>MLP_HB1</b>	0,35 ± 0,01	0,37 ± 0,06	0,42 ± 0,03	0,22 ± 0,01
<b>MLP_HB 1*</b>	0,35 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,34 ± 0,01
<b>MLP_HB 2</b>	0,39 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,18 ± 0,02
<b>MLP_HB 3</b>	0,42 ± 0,01	0,32 ± 0,06	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01
<b>MLP_HB 4</b>	0,50 ± 0,02	0,5 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,27 ± 0,01
<b>MLP_HB 5</b>	0,49 ± 0,01	0,61 ± 0,14	0,34 ± 0,01	0,18 ± 0,02

Nel caso degli MLP\_HB l'associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi è stata calcolata esclusivamente dopo purificazione per centrifugazione; anche in questo caso, si sono separate 3 fasi, un surnatante opalescente, in cui si è ipotizzato vi fossero liposomi e magnetoliposomi, un precipitato più o meno marrone, in cui si è supposto vi fossero prevalentemente magnetoliposomi, e un precipitato molto scuro e particolarmente compatto, in cui si è presunto vi fossero prevalentemente nanoparticelle libere. Come riportato nella tabella 18, il grado di caricamento della magnetite nelle strutture vescicolari sembrerebbe subire una flessione negativa all'aumentare della magnetite coinvolta nella formulazione. A tal proposito è interessante specificare che al termine del processo di centrifugazione la fase separata sul fondo della vial, presumibilmente magnetite non associata ai liposomi, è risultata essere visibilmente maggiore all'aumentare della quantità di magnetite coinvolta, indicando la riduzione dell'associazione % alle strutture vescicolari.

**Tabella 18**

<b>Campioni sonicati</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip. Centrifug.</b>
MLP_HL1	86,45
MLP_HL1*	93,21
MLP_HL2	76,91
MLP_HL3	65,81
MLP_HL4	71,6
MLP_HL5	64,7

Per verificare la distribuzione della magnetite nelle 3 fasi separate, la quantità di magnetite rilevata in ciascuna di esse è stata posta in relazione con la quantità totale presente in ciascun campione e quindi riportata nel grafico di Figura 42. Dal grafico è facile rendersi conto di come all'aumentare della concentrazione di magnetite coinvolta nella formulazione la % presente nel surnatante si riduca, mentre aumenti quella sul fondo della vial. Rimane stabile, ad eccezione della MLP\_HB3, la % intrappolata nella fase intermedia, costituita dalla frazione magnetoliposomiale maggiormente ricca in magnetite.



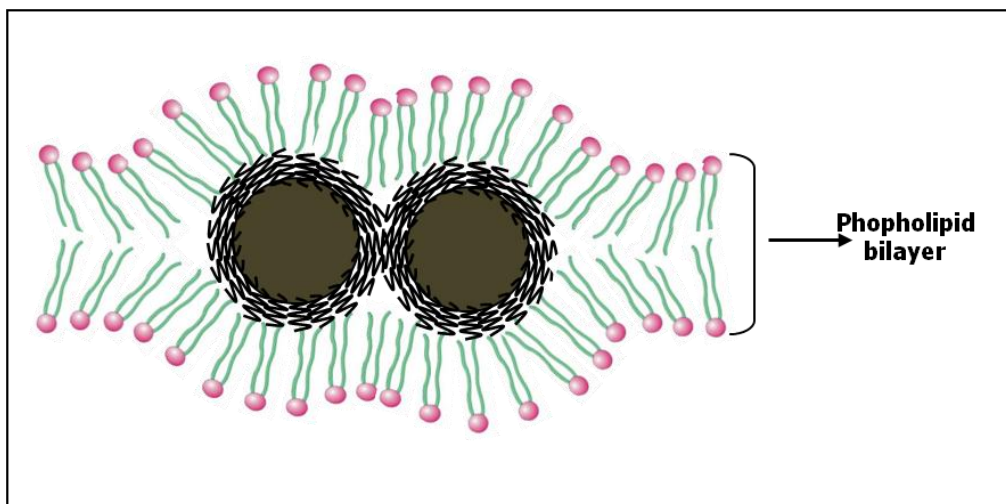
**Fig. 42** Distribuzione % delle HB\_SPION nelle 3 fasi separate per centrifugazione.

L'analisi morfologica degli MLP\_HB è stata condotta al microscopio elettronico a trasmissione ad alta risoluzione (HRTEM), al fine di mettere meglio in evidenza le caratteristiche già individuate nella **fase 1**.

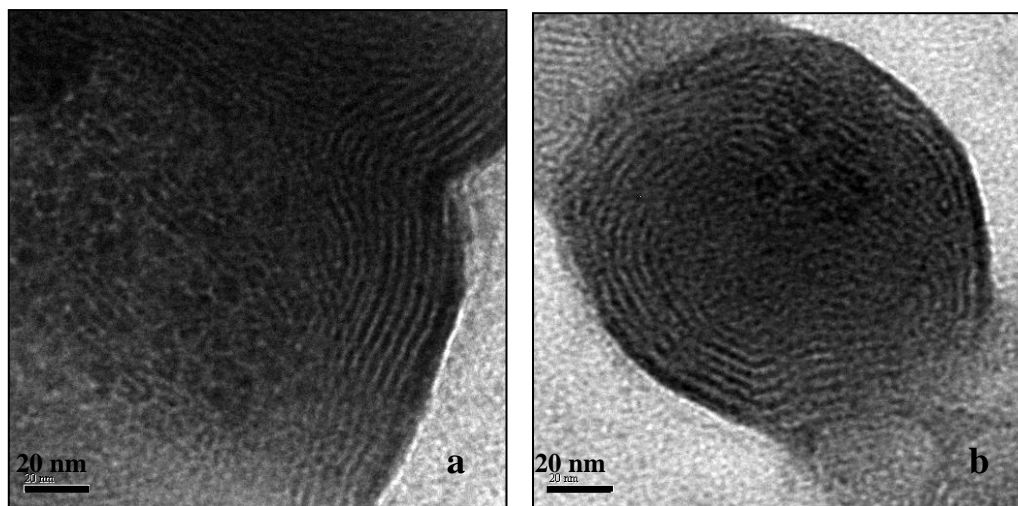
Come è possibile osservare dalle Figure 44, 46 e 47, sono presenti sia bilayers fosfolipidici addossati ad aggregati nanoparticellari o contemporaneamente nanoparticelle e bilayers. Tali configurazioni confermano ancora una volta la diretta interazione fosfolipidi-HB\_SPION e lasciano aperte le ipotesi 1 e 2 espresse nel sottoparagrafo 2.3.3.4.1.. A tal proposito si è ritenuto opportuno chiarire più dettagliatamente tali interazioni mediante delle rappresentazioni grafiche, riportate nelle Figure 43 e 45. La prima riporta l'ipotesi 1, ovvero



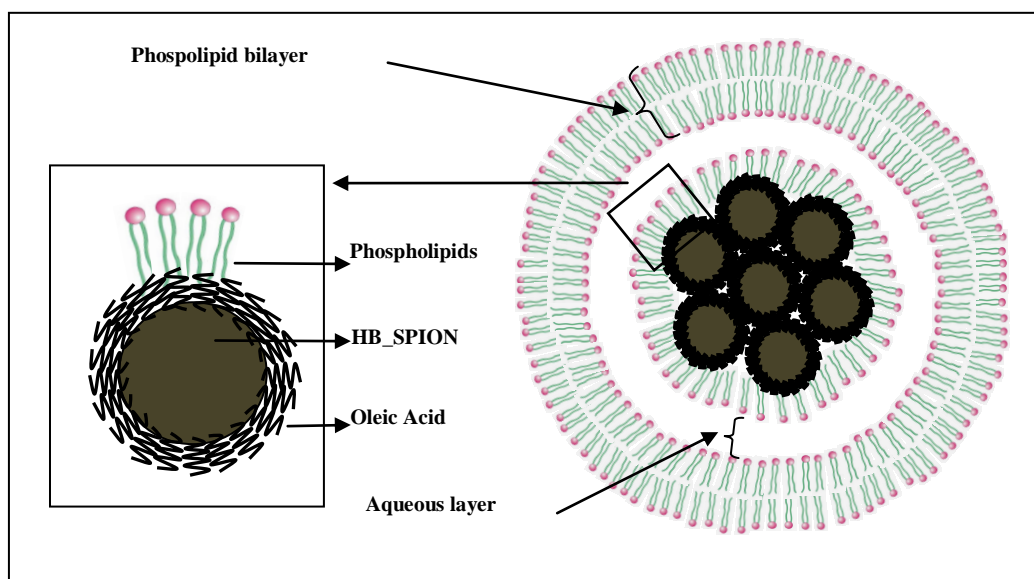
l'inclusione delle nanoparticelle idrofobiche all'interno di un doppio strato fosfolipidico, condizione particolarmente verosimile e indicativa di quanto riportato nelle foto 44 a) e b), mentre la seconda rappresenta l'ipotesi 2, relativa alla formazione di un nucleo di nanoparticelle aggregate direttamente circondato da un primo monolayer fosfolipidico e da eventuali bilayers successivi, configurazione particolarmente simile a quanto riportato nelle foto 46 a) e b).



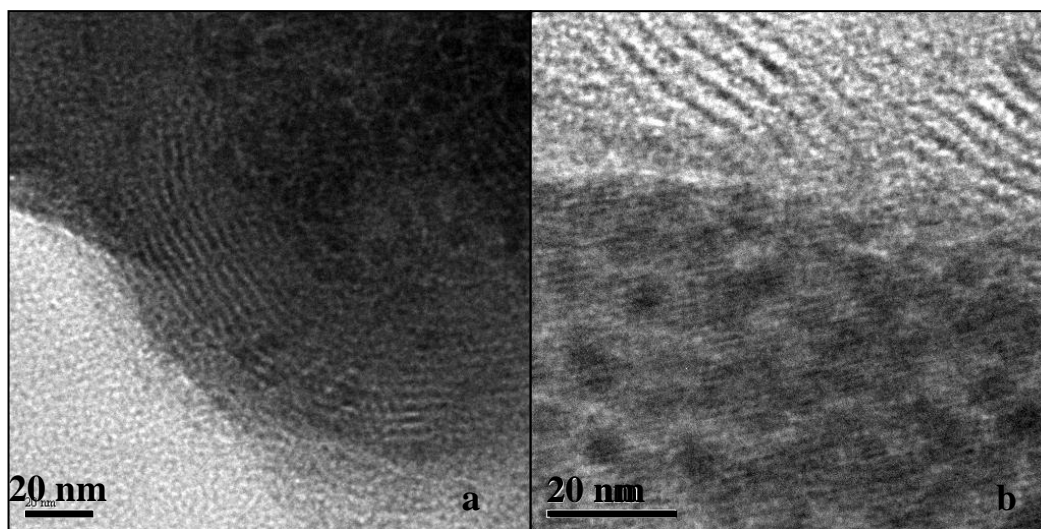
**Fig. 43** Rappresentazione schematica dell'ipotesi 1: le nanoparticelle di magnetite si trovano inserite all'interno di un bilayer fosfolipidico.



**Fig. 44 a) e b)** Immagini HRTEM di un campione MLP\_HB2 particolarmente rappresentative della configurazione descritta nell'ipotesi 1, in cui le nanoparticelle sono inserite nei bilayers fosfolipidici.

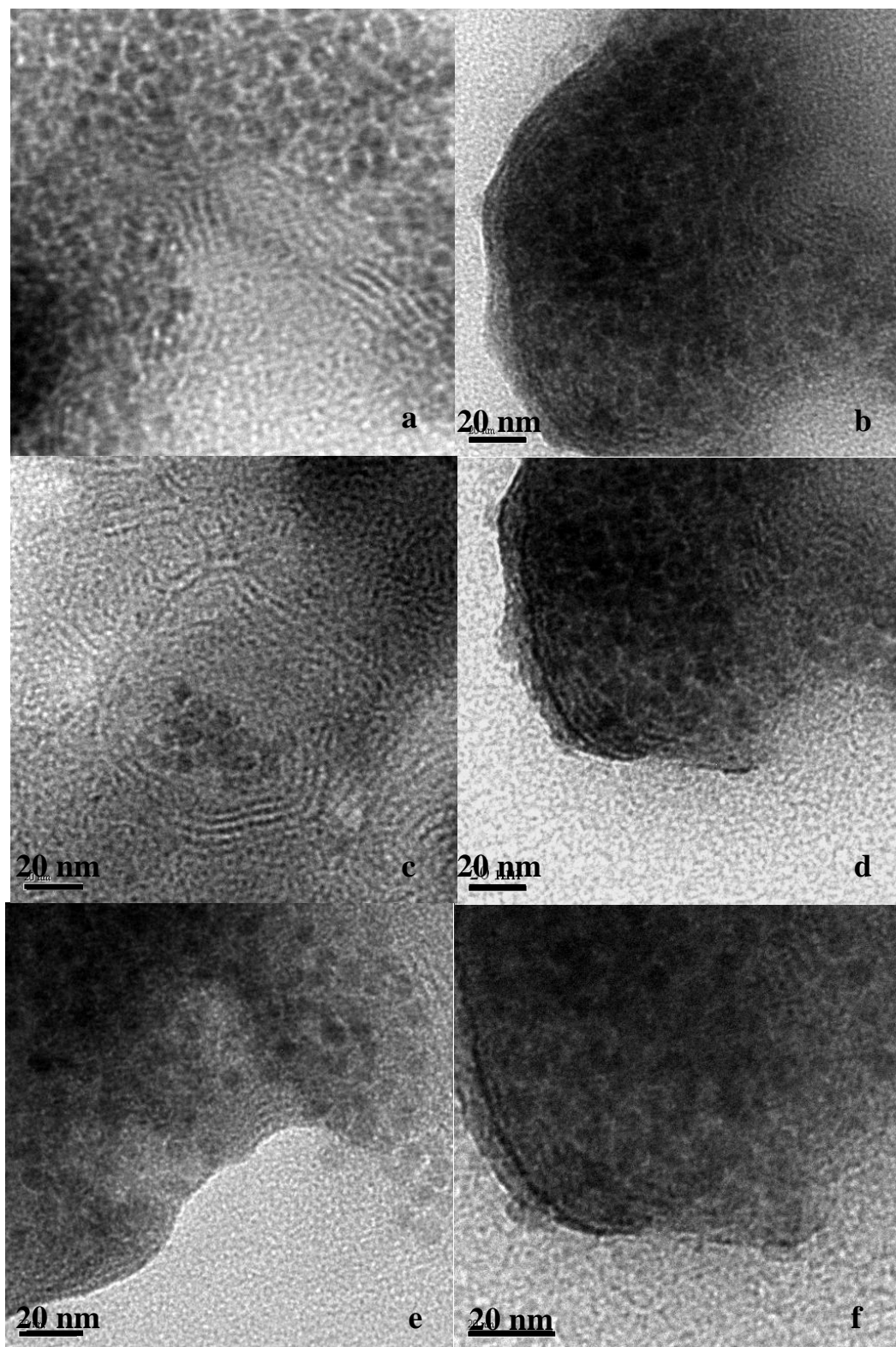


**Fig. 45** Rappresentazione schematica dell'ipotesi 2: le HB\_SPION formano un aggregato nanoparticellare che viene stabilizzato da un primo monolayer fosfolipidico a cui seguono poi successivi bilayers.



**Fig. 46 a) e b)** Immagini HRTEM di un campione MLP\_HB2 particolarmente rappresentative della configurazione descritta nell'ipotesi 2, in cui le nanoparticelle tendono a formare degli aggregati su cui viene ad adagiarsi un primo monolayer e a cui fanno seguito i successivi bilayers.





**Fig. 47 a-e)** Altre immagini HRTEM di un campione MLP\_HB2.

---

L'analisi morfologica HRTEM ha quindi confermato quanto già osservato nella **fase1** mediante indagine TEM.

#### *2.3.3.5.2. Conclusioni*

La presenza dell'acido oleico nella composizione delle nanoparticelle HB\_SPION gioca un ruolo fondamentale nel tipo di posizionamento nella struttura vescicolare derivante. Le HB\_SPION infatti, presentando dei forti legami di coordinazione (dativi) tra il Ferro (III) e il gruppo carbossilato dell'acido oleico, possiedono un forte carattere apolare, verosimilmente affine agli ambienti idrofobici delle code apolari fosfolipidiche. Quindi, pur non avendo una concreta sicurezza sul destino seguito dalle molecole dell'acido oleico in seguito al coinvolgimento delle HB\_SPION nella preparazione dei liposomi, si suppone che esse permangano sulle nanoparticelle e vadano direttamente ad interagire con le code idrofobiche dei fosfolipidi formando strutture vescicolari ripiene di nanoparticelle magnetiche, dotate, quindi, di un'elevata potenzialità di magnetizzazione. In realtà, però, l'elevato caricamento, sotto forma di nuclei densi nanoparticellari, potrebbe rappresentare anche uno dei principali motivi di instabilità del campione, a causa dell'elevata pesantezza delle strutture vescicolari derivanti, soprattutto all'aumentare della quantità di magnetite coinvolta nella formulazione.

Nonostante ciò, gli MLP\_HB rappresentano, nel complesso, un carrier vescicolare dotato di buone potenzialità, sia dal punto di vista magnetico che dal punto di vista tecnologico-farmaceutico; essi rappresentano, infatti, il primo esempio concreto (documentato attraverso svariate immagini TEM) di magnetoliposomi creati a partire da nanoparticelle idrofobiche pre-formate. Studi futuri atti a perfezionare la formulazione e a testarne la citotossicità in vitro sono sicuramente auspicabili al fine di dimostrarne la reale utilità in campo farmaceutico.

---

#### 2.3.3.6 Analisi MLP\_Ngp – fase 1

Verificate nella fase 1 degli MLP\_HB le buone prospettive offerte dalle nanoparticelle magnetiche idrofobiche, si è pensato di coinvolgere nello studio sperimentale un secondo tipo di nanoparticelle, anch'esse di natura apolare. In questo caso però, a differenza delle HB\_SPION, preparate in laboratorio, le HB\_Ngp sono state preparate su scala industriale.

In particolare, le HB\_Ngp sono state messe a nostra disposizione dall'azienda spagnola Nanogap<sup>®</sup>, specializzata nella produzione di particelle metalliche su scala nanometrica. I principali vantaggi associati all'uso di nanoparticelle prodotte su scala industriale sono riconducibili alla standardizzazione della metodica di sintesi applicata e alla ripetibilità delle caratteristiche chimico-fisiche del prodotto ottenuto. Tali specifiche, mantenendo costanti le procedure operazionali relative alla preparazione dei magnetoliposomi, determinano una notevole riduzione delle variabili che possono influire sul tipo di sistemi vescicolari ottenuti.

E' importante la diversa metodica utilizzata per la sintesi delle HB\_Ngp rispetto a quella delle HB\_SPION. In particolare, nel caso delle HB\_SPION la metodica è stata quella di Sun S. (2002) mentre nel caso delle HB\_Ngp 'Massart modificato'. Nel primo caso l'acido oleico utilizzato per la sintesi delle nanoparticelle viene coinvolto sin dai primi step di preparazione, quando ancora la nanoparticella non si è formata, mentre nel secondo caso viene coinvolto al termine della preparazione, quando la nanoparticella di magnetite si è già costituita, determinando una sorta di rivestimento superficiale. In entrambi i casi il legame acido oleico-Ferro (III) sembrerebbe comunque di tipo dativo e quindi piuttosto stabile. Risultano invece differenti i rapporti % magnetite:acido oleico delle nanoparticelle ottenute, 74:26 per le HB\_Ngp, 50:50 per le HB\_SPION. Analizzando quindi i 2 casi è curioso osservare come, pur parlando per entrambi di nanoparticelle idrofobiche, inizino a definirsi delle differenze non sottovalutabili, potenzialmente causa di notevoli differenze morfologico-strutturali tra i sistemi MLP\_Ngp ed MLP\_HB ottenuti. Tale considerazione mette in luce un aspetto particolarmente delicato e suscettibile di critica in riferimento ai lavori attualmente presenti in letteratura nell'ambito dei

---

magnetoliposomi; è infatti sorprendente che, nonostante vi siano numerosissimi lavori sperimentali sull'applicazione in vitro ed in vivo di carrier magnetici ottenuti a partire da nanoparticelle diversamente sintetizzate e stabilizzate, non vi siano almeno altrettanti lavori che vadano a caratterizzare i sistemi vescicolari ottenuti a seconda del tipo di nanoparticella magnetica utilizzata. Tale approccio scientifico, infatti, laddove venisse svolto, permetterebbe l'individuazione di molteplici combinazioni configurazionali (e non una o due, come mostrato in letteratura) e quindi offrirebbe la possibilità di scegliere, per le applicazioni in vivo, il sistema dotato delle caratteristiche migliori o di mettere in relazione i differenti risultati ottenuti con le diverse caratteristiche dei carrier magnetici utilizzati (non esclusivamente riferibili alle proprietà magnetiche, in alcuni casi riportate, ma anche a morfologia, dimensioni, potenziale zeta, disposizione della magnetite ecc.). Un'analisi più approfondita del lavoro sperimentale, che facesse luce sulla fase, solitamente oscura, relativa alla caratterizzazione dei sistemi applicati, permetterebbe un approccio consequenziale alla materia maggiormente ragionevole e costruttivo.

#### 2.3.3.6.1. Caratterizzazione MLP\_Ngp

Le formulazioni MLP\_Ngp della **fase1** sono state ottenute per idratazione del film sottile con acqua bidistillata e sono state sottoposte ad un processo di sonicazione caratterizzato da 5 cicli di 30 secondi, intervallati da 30 secondi di pausa. Sono state preparate un totale di tre formulazioni a concentrazione crescente in magnetite, come riportato nella tabella seguente.

**Tabella 19**

Formulazione	Conc. lipidica mmol/L	Conc. HL_SPION mmol/L	Conc. in HL_SPION mg/ml
MLP_Ngp 1	20	0,17	0,04
MLP_Ngp 2	20	0,86	0,2
MLP_Ngp 3	20	1,51	0,35

Inoltre, per tutte le formulazioni, sia sonicate che non sonicate, è stato misurato il diametro mediante DLLS e il potenziale zeta al giorno 1 e ogni settimana a seguire, per un mese. Le formulazioni, durante questo periodo, sono state conservate in frigorifero alla temperatura di 4°C e prima di ogni analisi sono state lasciate stemperare sino a temperatura ambiente e di seguito sottoposte ad un breve trattamento al vortex.

Osservando i grafici sull'andamento del diametro medio idrodinamico nel tempo (Fig. 48 a) è possibile rendersi conto che le formulazioni non sonicate presentano un diametro decrescente all'aumentare della concentrazione di magnetite applicata; tale risultato si discosta da quanto generalmente ottenuto nei campioni non sottoposti a sonicazione, solitamente di diametro abbastanza elevato, indipendentemente dalla quantità di magnetite coinvolta. Tale andamento vedremo che non verrà poi confermato nelle fasi di studio successive sugli MLP\_Ngp, risultando quindi un caso isolato.

Il potenziale zeta delle formulazioni non sonicate è simile per tutti i campioni, e non varia sensibilmente al trascorrere del tempo (Fig. 48 b).

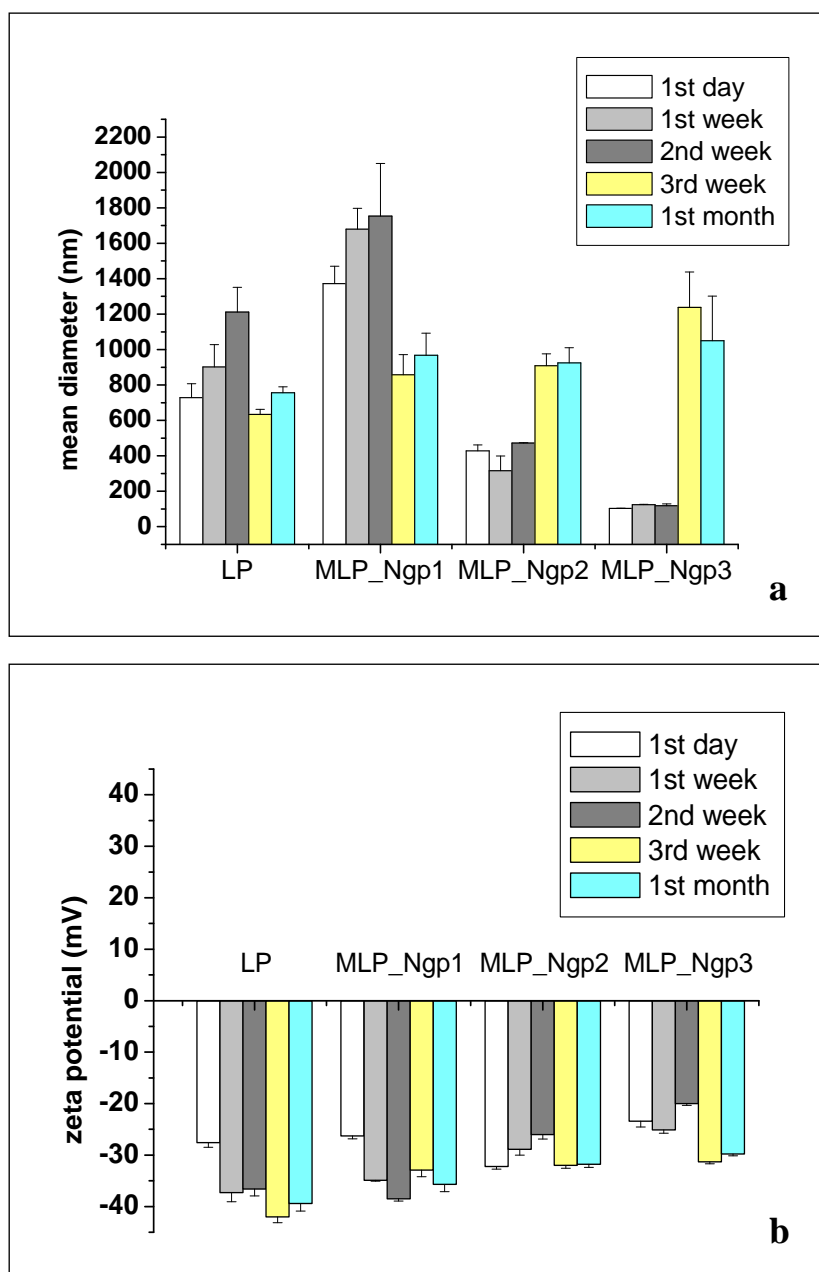
L'indice di polidispersione, come il diametro idrodinamico, segue un andamento decrescente all'aumentare della concentrazione di magnetite applicata. I campioni divengono comunque tutti ugualmente polidispersi con il passare del tempo (Tabella 20).

**Tabella 20**

	<b>1<sup>st</sup> day</b>	<b>1<sup>st</sup> week</b>	<b>2nd week</b>	<b>3<sup>rd</sup> week</b>	<b>1<sup>st</sup> month</b>
<b>LP</b>	0,75±0,07	0,75±0,02	0,79±0,04	0,58±0,02	0,65±0,03
<b>MLP_Ngp1</b>	0,79±0,06	0,86±0,08	0,89±0,07	0,70±0,04	0,75±0,04
<b>MLP_Ngp2</b>	0,45±0,03	0,37±0,04	0,48±0,00	0,78±0,03	0,85±0,04
<b>MLP_Ngp3</b>	0,26±0,02	0,19±0,01	0,43±0,12	0,76±0,13	0,78±0,13

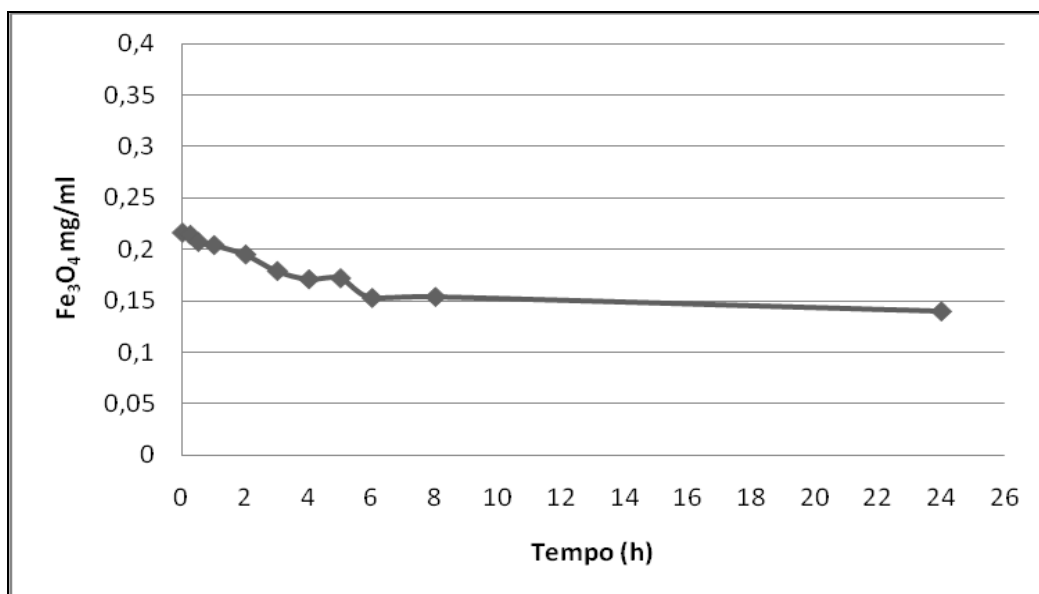
Per valutare il tempo necessario per la purificazione per dialisi, è stato eseguito uno studio preliminare con prelievi del campione osto nella membrana ad intervalli regolari fino alle 24 h, sottoposti di seguito al saggio della o-fenantrolina. L'analisi dei campioni ha permesso di graficare la concentrazione in magnetite di ciascun campione in funzione del tempo (h), mettendo in

evidenza un plateau tra la 4<sup>a</sup> e la 5<sup>a</sup> ora; dato tale risultato si è deciso di considerare pari a 4 ore il tempo ottimale per l'esecuzione della dialisi sui campioni MLP\_Ngp (Fig.49).



**Fig. 48** a) Diametro medio idrodinamico delle formulazioni MLP\_Ngp in funzione del tempo; b) potenziale zeta delle formulazioni MLP\_Ngp in funzione del tempo.





**Fig. 49** Andamento della concentrazione in magnetite di una formulazione MLP\_\_Ngp sottoposta a dialisi in funzione del tempo.

L'associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi relativa ai campioni non sonicati, riportata in tabella 21, non mostra variazioni significative all'aumentare della concentrazione di magnetite coinvolta. In tutti i casi si sono ottenuti dei valori di associazione superiori al 60%, che evidenziano l'idoneità del carrier vescicolare al trasporto della magnetite. La metodica di purificazione più semplice da applicare è risultata la centrifugazione, che ha dato luogo sempre alla separazione di 3 fasi; al contrario, qualche problema è stato rilevato nell'esecuzione della purificazione per gel cromatografia e dialisi.

**Tabella 21**

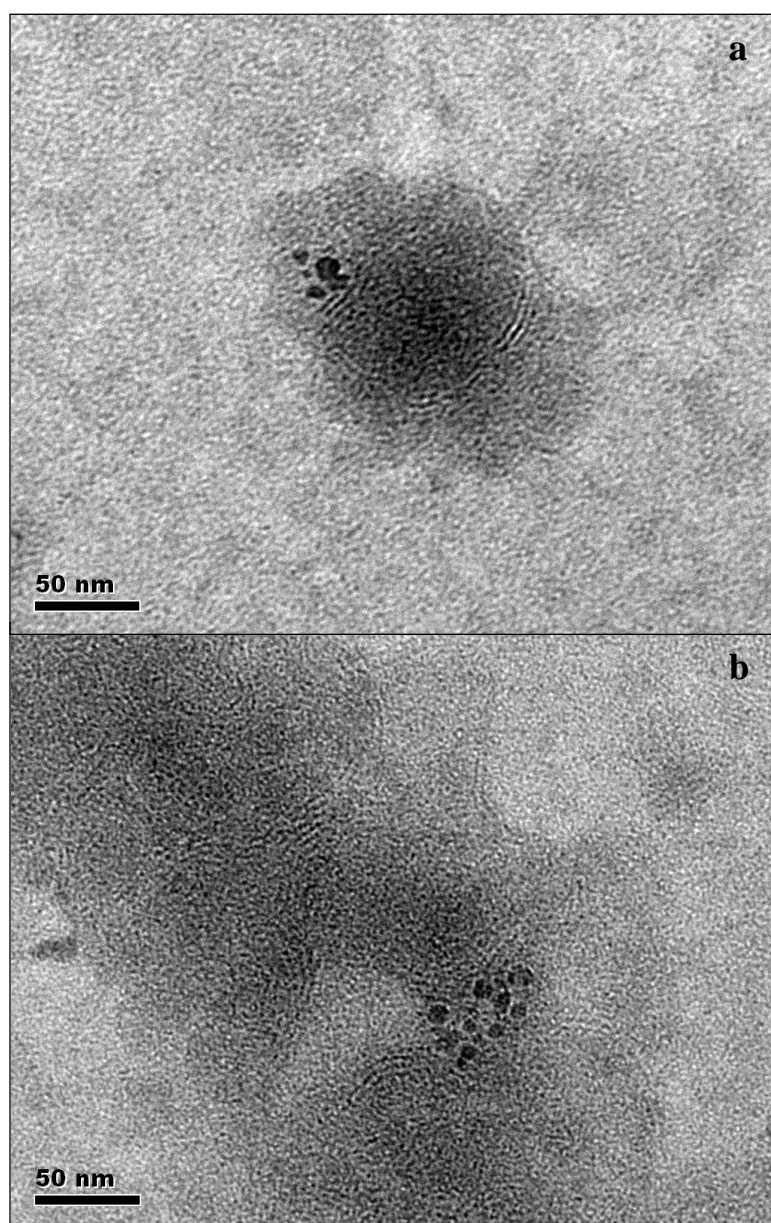
Campioni non sonicati	Assoc. % Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -lip. Dialisi	Assoc. % Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -lip Gel cromatografia	Assoc. % Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -lip centrifugazione
MLP_Ngp1	80,0	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
MLP_Ngp2	64,7	87,0	89,2
MLP_Ngp3	76,9	72,3	94,0

L'analisi TEM dei campioni MLP\_Ngp ha messo in evidenza la presenza sia di strutture vescicolari completamente vuote che di liposomi con nanoparticelle di magnetite incastonate nei bilayer fosfolipidici. Nelle foto di Figura 50 a) e b) è infatti visibile la contemporanea presenza di nanoparticelle e lamelle,

---

disposizione che mette in luce una probabile interazione fosfolipidi-magnetite, nonché acido oleico-fosfolipidi, data la presenza dell'acido grasso sulla superficie delle nanoparticelle magnetiche.

Quanto appena detto andrebbe a coincidere con la configurazione degli MLP\_HB proposta con l'ipotesi 1 (sottoparagrafo 2.3.3.4.1., rappresentazione schematica di Fig. 43). Per gli MLP\_Ngp non è mai stata riscontrata la configurazione ricorrente degli MLP\_HB proposta con l'ipotesi 2 (sottoparagrafo 2.3.3.4.1., rappresentazione schematica di Fig. 45), caratterizzata dalla formazione di un nucleo denso di nanoparticelle circondato da lamelle.



**Fig. 50 a) e b)** Immagini TEM di un campione MLP\_Ngp2 non sonificato.

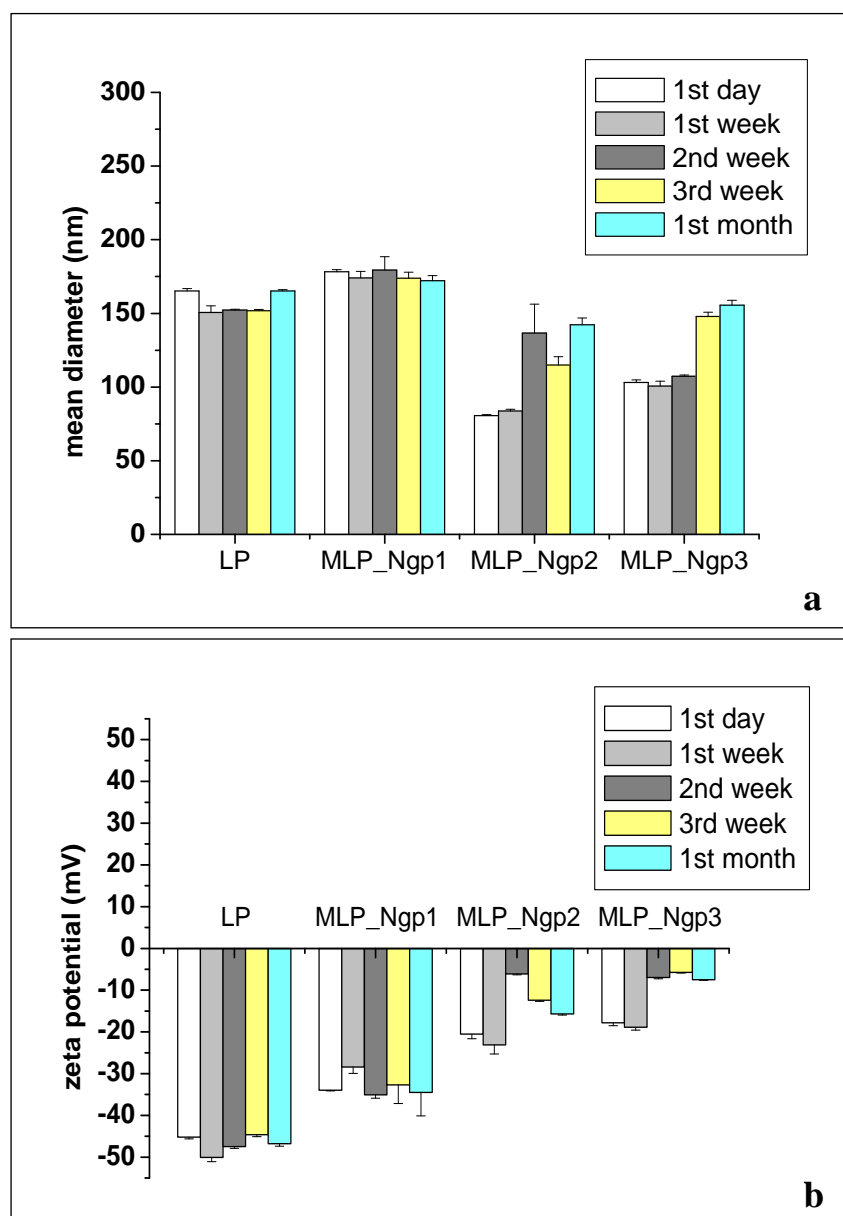
---

---

I differenti risultati ottenuti tra gli MLP\_HB e gli MLP\_Ngp potrebbe essere correlato ad alcuni dettagli distintivi sia delle HB\_SPION che delle HB\_Ngp, che rendono tali nanocolloidi magnetici fundamentalmente non identici o non completamente paragonabili tra loro, come già discusso nel paragrafo precedente. Infatti, pur essendo entrambe le nanoparticelle di tipo idrofobico, le HB\_SPION sono state preparate con la metodica di Sun.S. (2002) e presentano un rapporto % magnetite:acido oleico pari a 50:50; mentre, le HB\_Ngp sono state prodotte con la metodica di 'Massart modificato', dando luogo ad un rapporto % magnetite:acido oleico pari a 74:26. In quest'ultimo caso, quindi, l'acido oleico è presente esclusivamente sottoforma di rivestimento esterno, in quanto aggiunto nelle ultime fasi di preparazione, mentre, nel caso delle HB\_SPION un eventuale coinvolgimento dell'acido grasso nelle parti più profonde potrebbe non essere escluso. Inoltre, nelle HB\_Ngp risultano presenti, dallo spettro FTIR, catene di acido oleico libere, ovvero non legate covalentemente al Ferro, le quali, durante la formulazione delle vescicole, potrebbero staccarsi dalla magnetite, andando ad aumentare il rapporto % Magnetite/acido oleico e a modificare le proprietà della nanoparticella, soprattutto in relazione alle possibili interazioni con l'ambiente circostante.

Le dimensioni dei campioni sonicati, anche in questo caso, come nella **fase 2** degli MLP\_HL, risultano notevolmente ridotte rispetto a quelle dei campioni non sonicati. Le formulazioni MLP\_Ngp 2 e 3 sonicate, partendo già da un diametro medio idrodinamico ridotto, hanno presentato dimensioni notevolmente inferiori rispetto al campione MLP\_Ngp1 sonicato (Fig. 51 a).

Per quanto concerne invece il potenziale zeta di partenza, al contrario di quanto verificato nel caso dei campioni non sonicati, in cui è risultato molto simile in tutte le formulazioni, nei campioni sonicati si è osservato che all'aumentare della quantità di magnetite coinvolta, il valore si avvicina allo zero (Fig. 51b).



**Fig. 51** a) Diametro medio idrodinamico delle MLP\_Ngp sonicate in funzione del tempo; b) Potenziale zeta delle MLP\_Ngp sonicate in funzione del tempo.

L'indice di polidispersione delle formulazioni sonicate, con valori intorno a 0,3, ha indicato l'ottenimento di un sistema sufficientemente omogeneo e quasi monodisperso. Nelle formulazioni MLP\_Ngp 2 e 3, riportato in tabella 22, l'omogeneità del sistema è venuta meno con il passare del tempo.

**Tabella 22.**

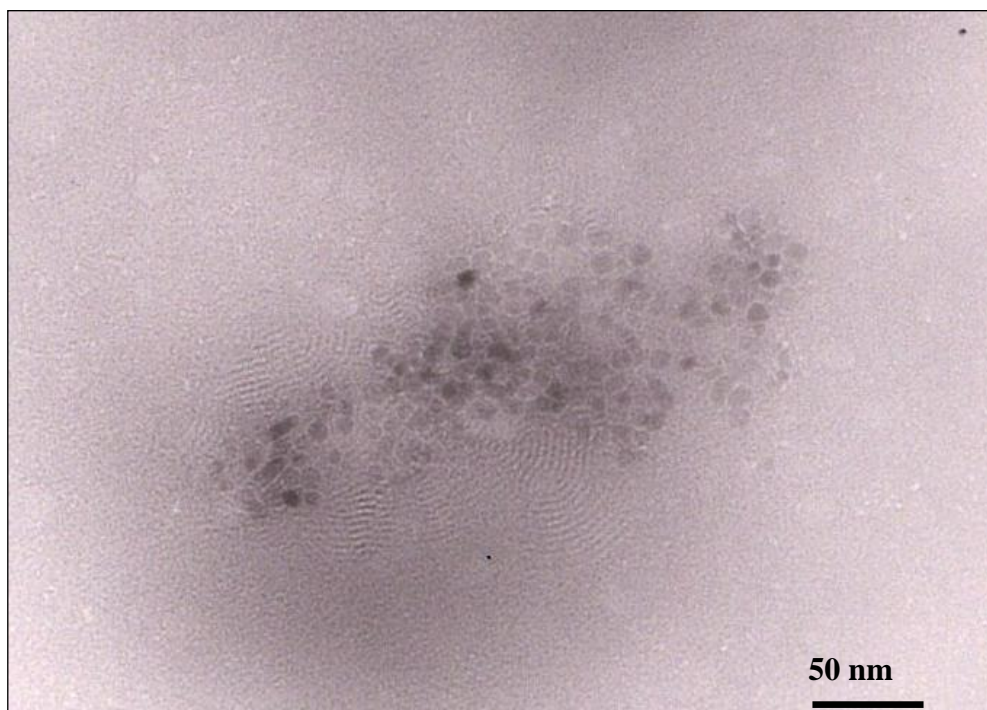
	1 <sup>st</sup> day	1 <sup>st</sup> week	2nd week	3 <sup>rd</sup> week	1 <sup>st</sup> month
<b>LP</b>	0,29± 0,02	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01
<b>MLP_Ngp1</b>	0,24 ±0,01	0,25± 0,02	0,30 ± 0,01	0,18± 0,02	0,22 ± 0,02
<b>MLP_Ngp2</b>	0,21 ± 0,01	0,24± 0,01	0,39± 0,13	0,64± 0,04	0,66 ± 0,04
<b>MLP_Ngp3</b>	0,32 ± 0,05	0,35± 0,04	0,40 ± 0,01	0,66± 0,04	0,68 ± 0,04

La valutazione dell'associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi è risultata particolarmente difficile nei campioni purificati per gel cromatografia, in quanto dopo l'esecuzione del saggio si sono spesso ottenuti dei valori superiori rispetto a quelli attesi. E' stato quindi necessario ripetere la purificazione numerose volte e ottenendo comunque dei valori scarsamente attendibili. Al contrario, è stato ritenuto attendibile la purificazione per centrifugazione. Infatti, la concentrazione di magnetite misurata nel campione di partenza corrispondeva, dopo ogni trattamento, alla somma della magnetite presente 3 fasi separate per centrifugazione. L'associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi è risultata anche in questo caso molto elevata, con valori sempre > al 70%, come riportato in Tabella 23.

**Tabella 23**

<b>Campioni sonicati</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip. Dialisi</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip Gel cromatog.</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip centrifugazione</b>
MLP_Ngp1	91,4	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
MLP_Ngp2	93,7	97,0	71,0
MLP_Ngp3	92,5	<i>n.d.</i>	82,2

L'indagine TEM dei campioni sonicati ha messo in evidenza oltre alla presenza delle stesse strutture presenti nei campioni non sonicati, anche la presenza di gruppi di nanoparticelle circondate da lamelle, come riportato in Figura 52. Questo tipo di configurazione si distingue comunque da quella osservata negli MLP\_HB, in quanto gli aggregati, in questo caso, non risultano sferici, ma di forma abbastanza irregolare.



**Fig. 52** Immagine TEM di un campione MLP\_Ngp sonicato.

#### 2.3.3.6.2. Conclusioni

L'analisi morfologica dei campioni ottenuti in questa prima fase sugli MLP\_Ngp ha messo in evidenza la contemporanea presenza di nanoparticelle magnetiche e di lamelle fosfolipidiche, sottolineando l'esistenza di una reale interazione tra le HB\_Ngp e le strutture vescicolari. Anche in questo caso, quindi, come per le HB\_SPION, le nanoparticelle idrofobiche HB\_Ngp hanno mostrato buone potenzialità per lo sviluppo di carrier magnetici. Tuttavia, in questa fase risulta essere ancora poco chiara l'influenza della concentrazione di magnetite applicata sul grado di associazione magnetite-liposomi. Per questo motivo il programma di lavoro nella **fase 2** è stato ampliato con l'esecuzione di formulazioni supplementari.



#### 2.3.3.7. *Analisi MLP\_Ngp – fase 2*

In questa fase sperimentale, la sonicazione, intensificata, è stata eseguita immergendo il campione in un bagnetto di ghiaccio, sia per evitare un eccessivo riscaldamento della formulazione, sia per se il calore influisse sulla riduzione delle dimensioni del sistema vescicolare. Inoltre, come eseguito anche per le altre formulazioni magnetoliposomiali, al fine di garantire un pH pari a 7, l'acqua bidistillata utilizzata per l'idratazione del film sottile è stata sostituita con il tampone fosfato.

Inoltre, il piano di lavoro è stato ampliato con la preparazione di formulazioni supplementari, una a concentrazione in magnetite intermedia rispetto alle precedenti già svolte (MLP\_Ngp1\*) e due a concentrazione superiore (MLP\_Ngp 4 e 5).

##### 2.3.3.7.1. *Caratterizzazione MLP\_Ngp*

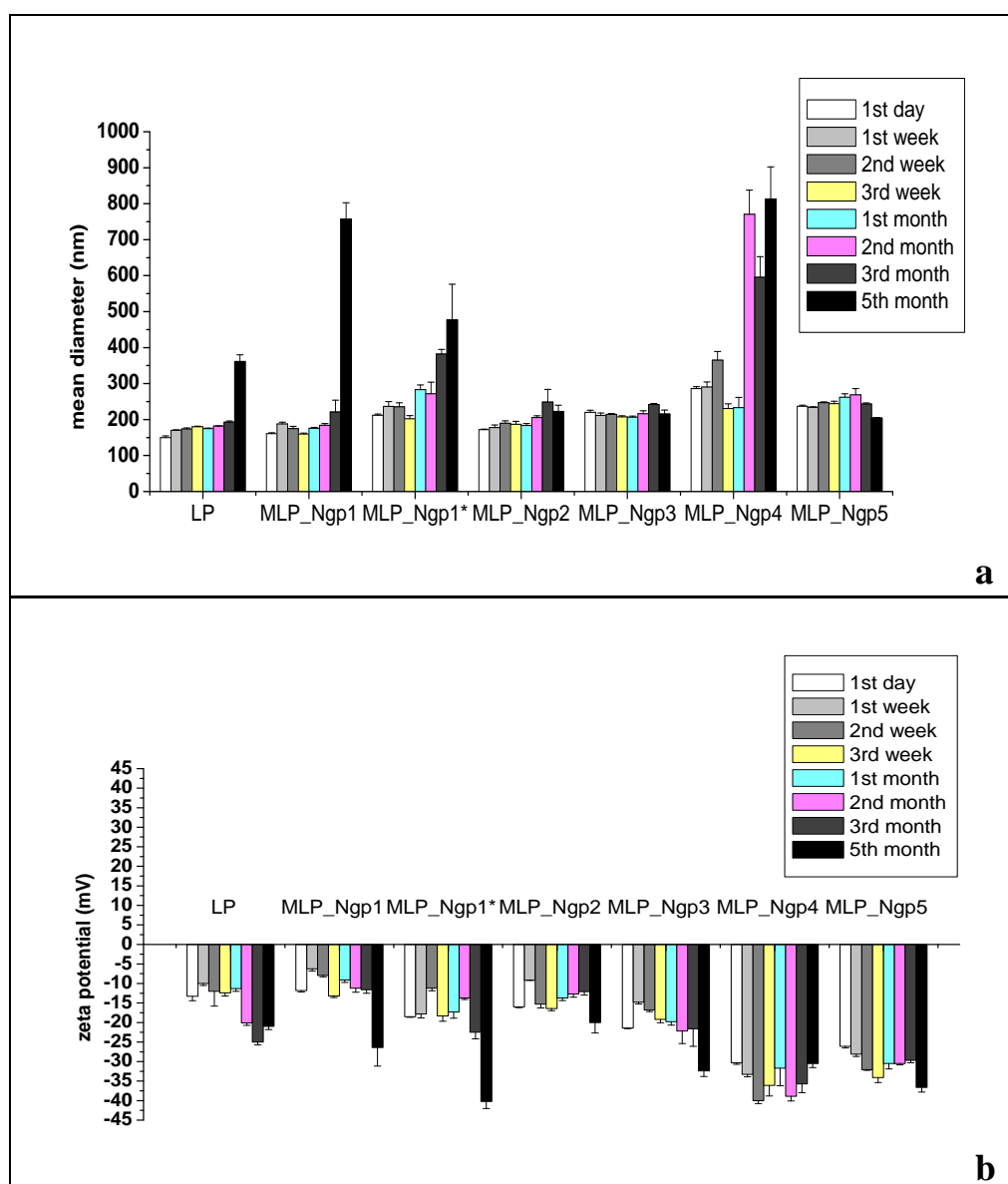
In questa fase sperimentale sono state eseguite un totale di 6 formulazioni a concentrazione crescente in magnetite, come riportato in tabella 24.

**Tabella 24**

Formulazione	Conc. lipidica mmol/L	Conc. HL_SPION mmol/L	Conc. in HL_SPION mg/ml
MLP_Ngp 1	20	0,17	0,04
MLP_Ngp 1*	20	0,43	0,10
MLP_Ngp 2	20	0,86	0,20
MLP_Ngp 3	20	1,51	0,35
MLP_Ngp 4	20	2,80	0,65
MLP_Ngp 5	20	4,30	1,00

Anche nel caso degli MLP\_Ngp è stato applicato il processo di sonicazione, da 10 cicli di 30 secondi ciascuno intervallati da 30 secondi di pausa, applicato sia nella fase 3 degli MLP\_HL che nella fase 2 degli MLP\_HB, apportando però come piccola variazione, l'utilizzo di un bagnetto per raffreddare il campione. Confrontando il diametro medio idrodinamico degli LP e degli MLP\_Ngp1 sonicati della **fase1** con quelli dei campioni sonicati della **fase 2** è possibile

rendersi conto di come, nonostante si siano utilizzati dei parametri ultrasonici più forti, la presenza del bagnetto di ghiaccio abbia ridotto l'effetto della riduzione del diametro medio idrodinamico. Come è possibile osservare dal grafico di figura 53 a) tutti i campioni hanno presentato un diametro medio idrodinamico iniziale paragonabile, stabile fino al 3°-5° mese, ad eccezione del campione MLP\_Ngp 4, il quale è andato incontro ad una destabilizzazione a partire dal 2° mese.



**Fig 53 a)** Diametro medio idrodinamico delle MLP\_Ngp sonicate in funzione del tempo; **b)** Potenziale zeta delle MLP\_Ngp sonicate in funzione del tempo.



I valori di potenziale zeta iniziali delle formulazioni MLP\_Ngp 1, 1\*, 2 sono risultati paragonabili, mentre a partire dalla formulazione MLP\_Ngp 3 il valore tende a decrescere; in generale, il potenziale zeta si è ulteriormente ridotto tra il 3° e il 5° mese.

Anche l'indice di polidispersione, ha risentito in maniera evidente della presenza del raffreddamento durante il processo di sonicazione, presentando dei valori intorno a 0,4-0,5, addirittura superiori a quelli ottenuti nella fase 1 (Tabella 25).

**Tabella 25**

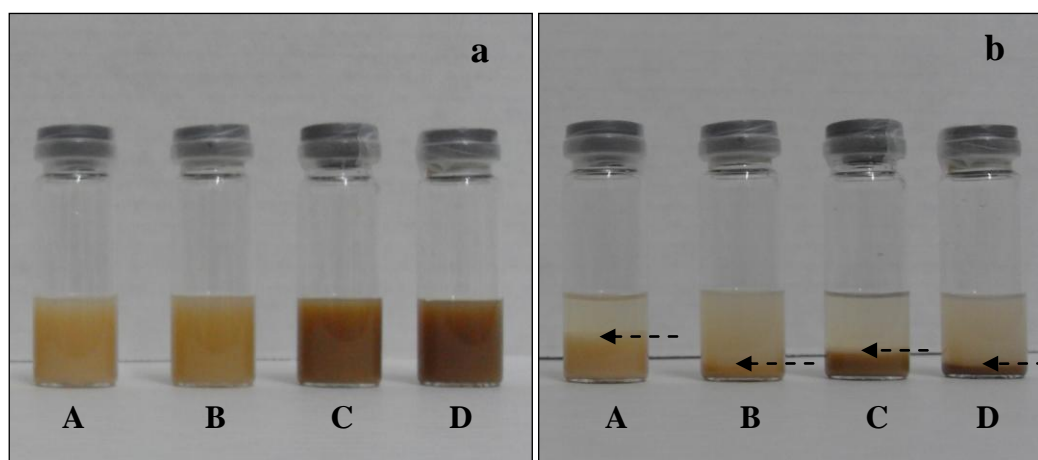
	<b>1<sup>st</sup> day</b>	<b>1<sup>st</sup> month</b>	<b>3<sup>rd</sup> month</b>	<b>5<sup>th</sup> month</b>
<b>LP</b>	0,35±0,01	0,36±0,04	0,37±0,02	0,48±0,01
<b>MLP_Ngp1</b>	0,42±0,01	0,43±0,03	0,50±0,13	0,47±0,06
<b>MLP_Ngp1*</b>	0,55±0,04	0,40±0,03	0,49±0,03	0,48±0,09
<b>MLP_Ngp2</b>	0,42±0,04	0,50±0,06	0,49±0,15	0,52±0,10
<b>MLP_Ngp3</b>	0,50±0,02	0,56±0,11	0,53±0,04	0,61±0,04
<b>MLP_Ngp4</b>	0,51±0,02	0,35±0,04	0,66±0,04	0,61±0,02
<b>MLP_Ngp5</b>	0,49±0,01	0,63±0,18	0,54±0,01	0,44±0,01

Anche le formulazioni MLP\_Ngp, come in generale le altre formulazioni magnetoliposomiali, sono solitamente andate incontro ad una spontanea separazione di fasi per semplice conservazione a riposo. In particolare, nelle formulazioni non sonicate si è separato un corpo di fondo dopo circa 3 h di riposo, mentre nelle sonicate dopo circa 6h. La separazione è stata visualizzata attraverso foto scattate sui campioni subito dopo agitazione manuale e dopo diverse ore di riposo, sia non sonicati che sonicati.

Nelle foto di figura 54 sono raffigurate le formulazioni MLP\_Ngp 2 e 3.

Come è possibile osservare dalla Fig. 54 b) le formulazioni sonicate presentano un corpo di fondo volumetricamente molto inferiore rispetto a quello formatosi nelle formulazioni non sonicate, mettendo in evidenza il fatto che la riduzione delle dimensioni del sistema disperso comporta una separazione di fasi più limitata e rallentata. E' inoltre facile osservare che il surnatante dei campioni sonicati è più opalescente rispetto a quello dei non sonicati, a conferma che il

ridotto corpo di fondo dei sonicati è dovuto ad una maggiore dispersione nel surnatante.



**Fig. 54** **A** = MLP\_Ngp 2 non sonicato; **B** = MLP\_Ngp 3 non sonicato; **C** = MLP\_Ngp 2 sonicato; **D** = MLP\_Ngp 3 sonicato - **a)** campioni MLP\_Ngp subito dopo agitazione manuale; **b)** campioni MLP\_Ngp dopo svariate ore a riposo.

Per spontanea separazione non è invece visibile la separazione della magnetite libera o comunque non stabilizzata nelle strutture vescicolari, che viene invece facilmente separata sul fondo della vial per applicazione della centrifugazione.

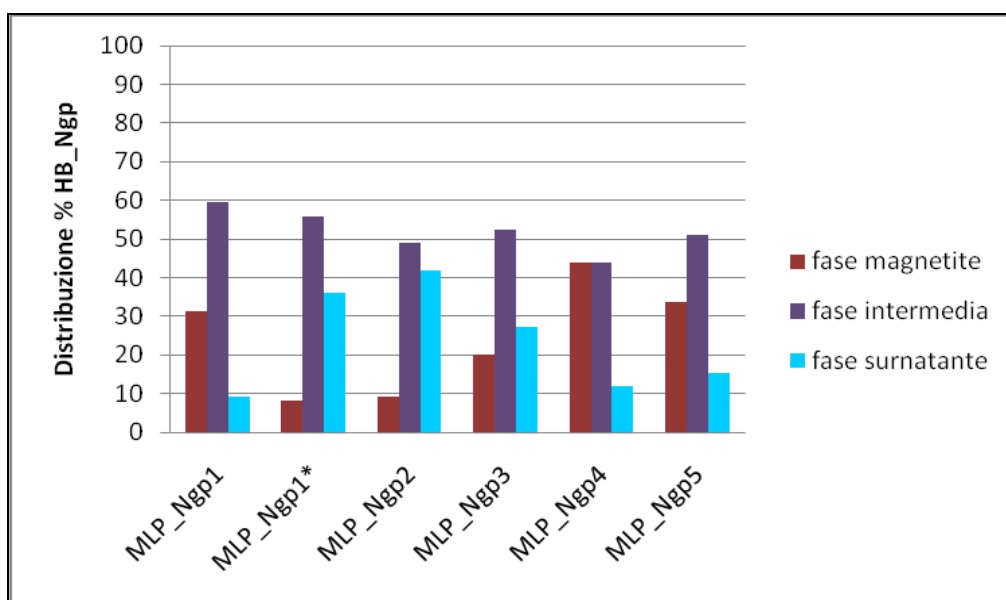
Per valutare l'Associazione %  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -liposomi è stato ritenuto opportuno eseguire esclusivamente la centrifugazione, come anche effettuato nella **fase 2** degli MLP\_HB, in quanto è stata in generale la metodica meno inficiata da errore, soprattutto per il carattere apolare delle HB\_Ngp. Anche in questo caso, dopo centrifugazione si è ottenuta la separazione di 3 fasi, un surnatante opalescente, un precipitato più o meno marrone, a seconda del contenuto in magnetite, e un precipitato molto scuro. Al fine della valutazione dell'associazione %  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -liposomi, sono stati tenuti in considerazione i quantitativi di magnetite rilevati nel surnatante e nel precipitato marrone, escludendo la parte sottostante molto scura e compatta, presumibilmente costituita da nanoparticelle di magnetite libere. Come è possibile osservare dalla Tabella 26 l'associazione % sembra subire un'importante flessione negativa a partire dalla 3<sup>a</sup> formulazione.

---

**Tabella 26**

Campioni sonicati	Assoc. % Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -lip centrifugazione
MLP_Ngp1	68,63
MLP_Ngp1*	91,23
MLP_Ngp2	87,9
MLP_Ngp3	75,93
MLP_Ngp4	64,67
MLP_Ngp5	57,2

Per valutare meglio la distribuzione della magnetite nelle 3 fasi separate, il grafico di Figura 55 riporta la percentuale di ciascuna fase rispetto alla quantità totale di magnetite presente in ciascun campione.. Come è possibile osservare dall'andamento sul grafico, la quantità di magnetite presente nella fase intermedia (magnetoliposomi) rimane pressochè costante all'aumentare della concentrazione coinvolta, mentre si riduce la quantità nel surnatante ed aumenta quella nel precipitato scuro (ad eccezione del campione MLP\_Ngp1). Tale andamento è simile a quello riscontrato negli MLP\_HB centrifugati (sottoparagrafo 2.3.3.5.1.).



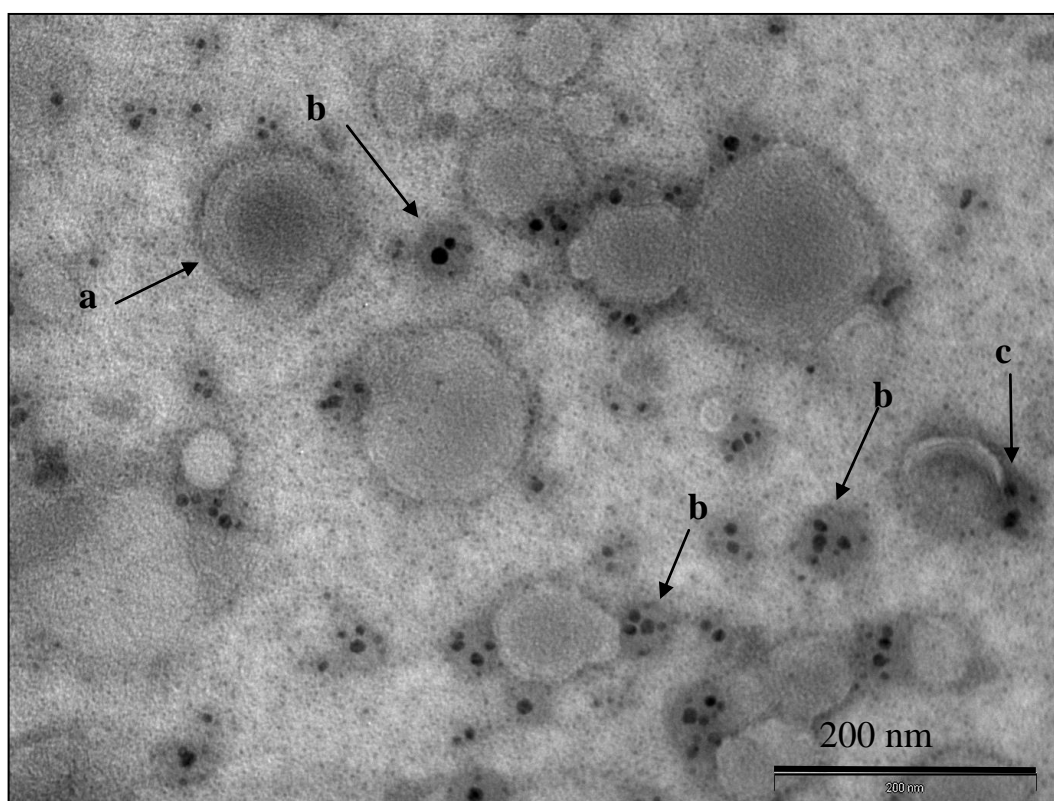
**Fig. 55** Distribuzione % delle HB\_Ngp nelle 3 fasi separate per centrifugazione.

---

---

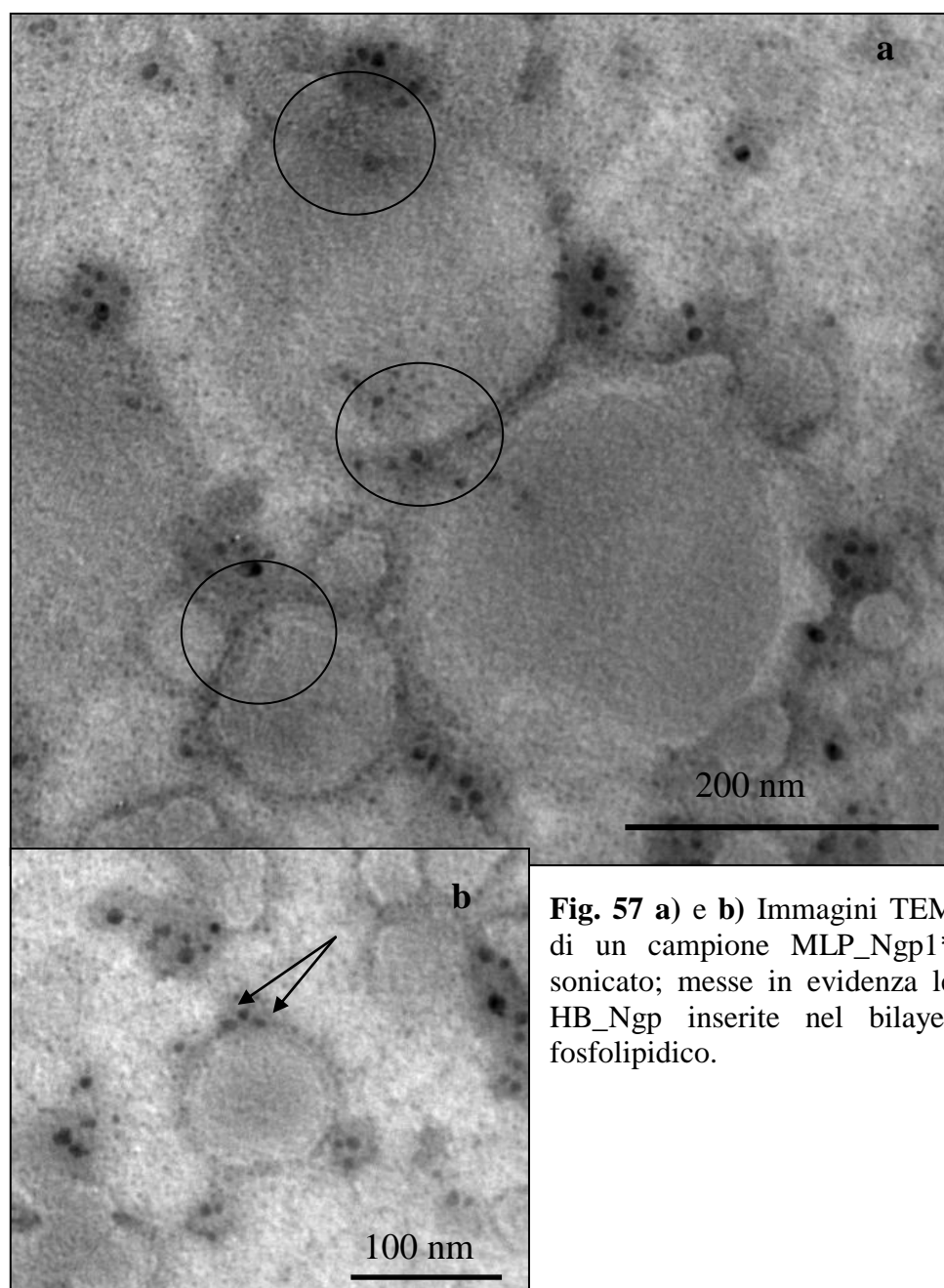
Molto interessante è risultata essere la valutazione TEM dei campioni MLP\_Ngp. In particolare, si è voluto visualizzare le caratteristiche morfologiche principali di alcuni campioni sonicati e quelle relative alle 3 fasi separate in seguito a centrifugazione.

Nei campioni non purificati le principali strutture messe in evidenza sono state sistemi vescicolari vuoti, sistemi vescicolari aventi nanoparticelle inserite nei bilayer fosfolipidici e piccole strutture vescicolari di circa 50 nm, incapsulanti ciascuna 4 o 5 nanoparticelle, e, ovviamente, nanoparticelle libere, come messo in evidenza nella foto di Figura 56.



**Fig. 56** Immagine TEM di un campione MLP\_Ngp1\*sonicato; in evidenza **a**) un sistema vescicolare vuoto, **b**) delle piccole strutture circolari contenenti 2-5 nanoparticelle HB\_Ngp, **c**) delle nanoparticelle localizzate in corrispondenza del bilayer fosfolipidico.

Nelle foto di Figura 57 risulta chiaramente visibile il posizionamento di alcune HB\_Ngp in corrispondenza dei bilayers.

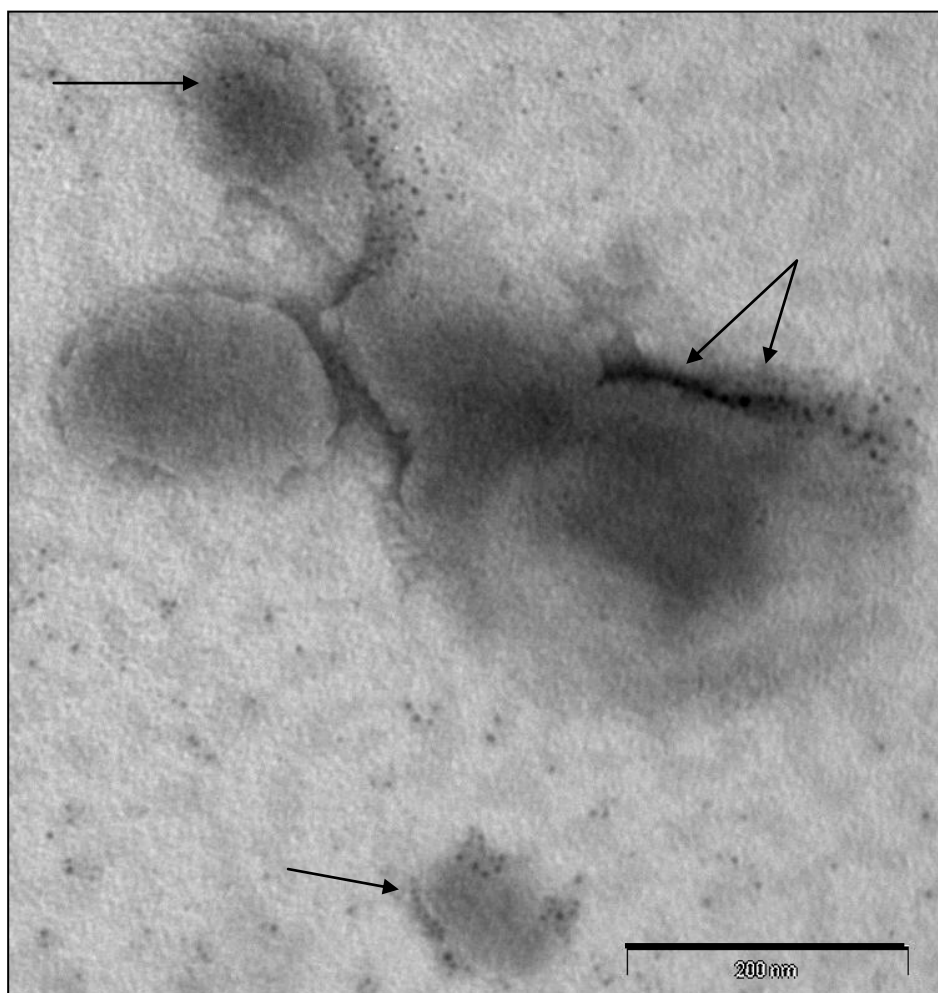


**Fig. 57 a) e b)** Immagini TEM di un campione MLP\_Ngp1\* sonicato; messe in evidenza le HB\_Ngp inserite nel bilayer fosfolipidico.



---

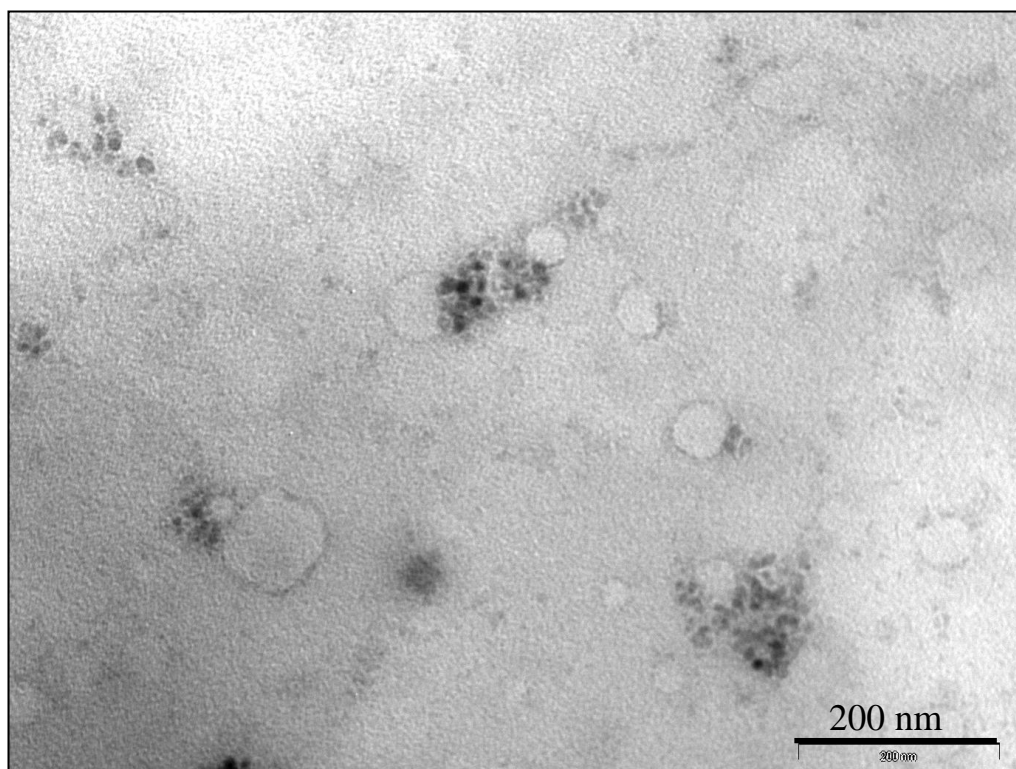
Anche nella foto di Figura 58, relativa ad un campione MLP\_Ngp2 sonicato, risultano visibili delle zone in cui nanoparticelle e materiali fosfolipidico sono presenti contemporaneamente.



**Fig. 58** Immagine TEM di un campione MLP\_Ngp2 sonicato.

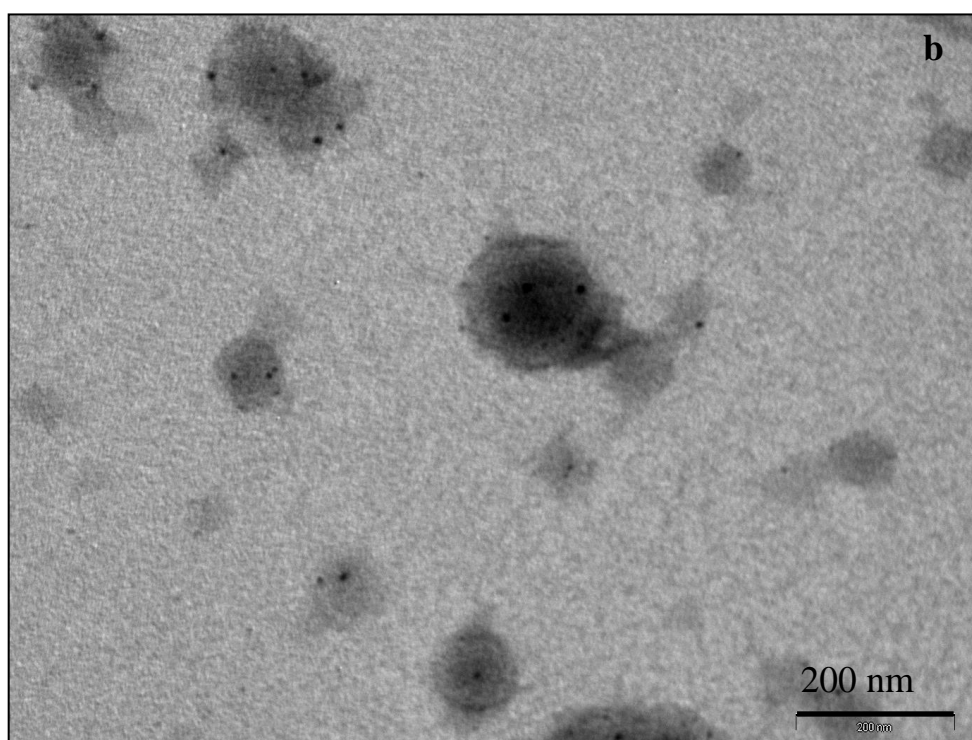
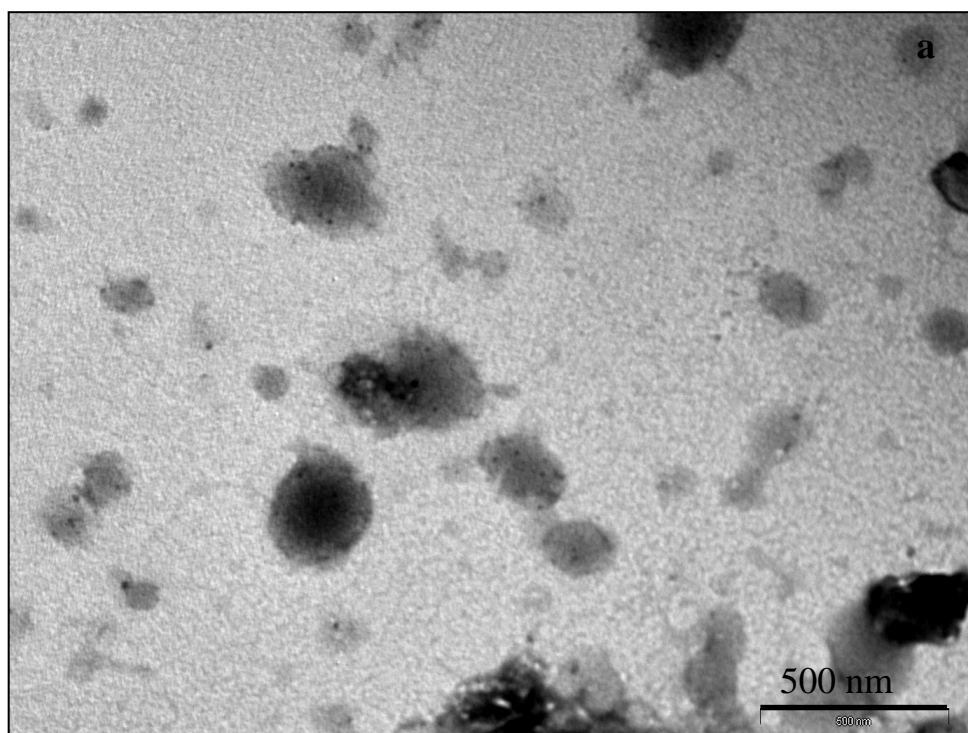
La valutazione TEM delle 3 fasi separate per centrifugazione del campione MLP\_Ngp2 sonicato ha permesso di evidenziare l'effettiva composizione delle 3 parti e quindi di confermare o meno quanto a riguardo ipotizzato.

Nel surnatante, in particolare, sono stati osservati piccoli liposomi vuoti e magnetoliposomi, costituiti da strutture vescicolari unilamellari su cui si trovano aggrappati, a cavallo tra il bilayer fosfolipidico e l'ambiente acquoso esterno, gruppi di 5-10 nanoparticelle, come mostrato nella Foto di figura 59.



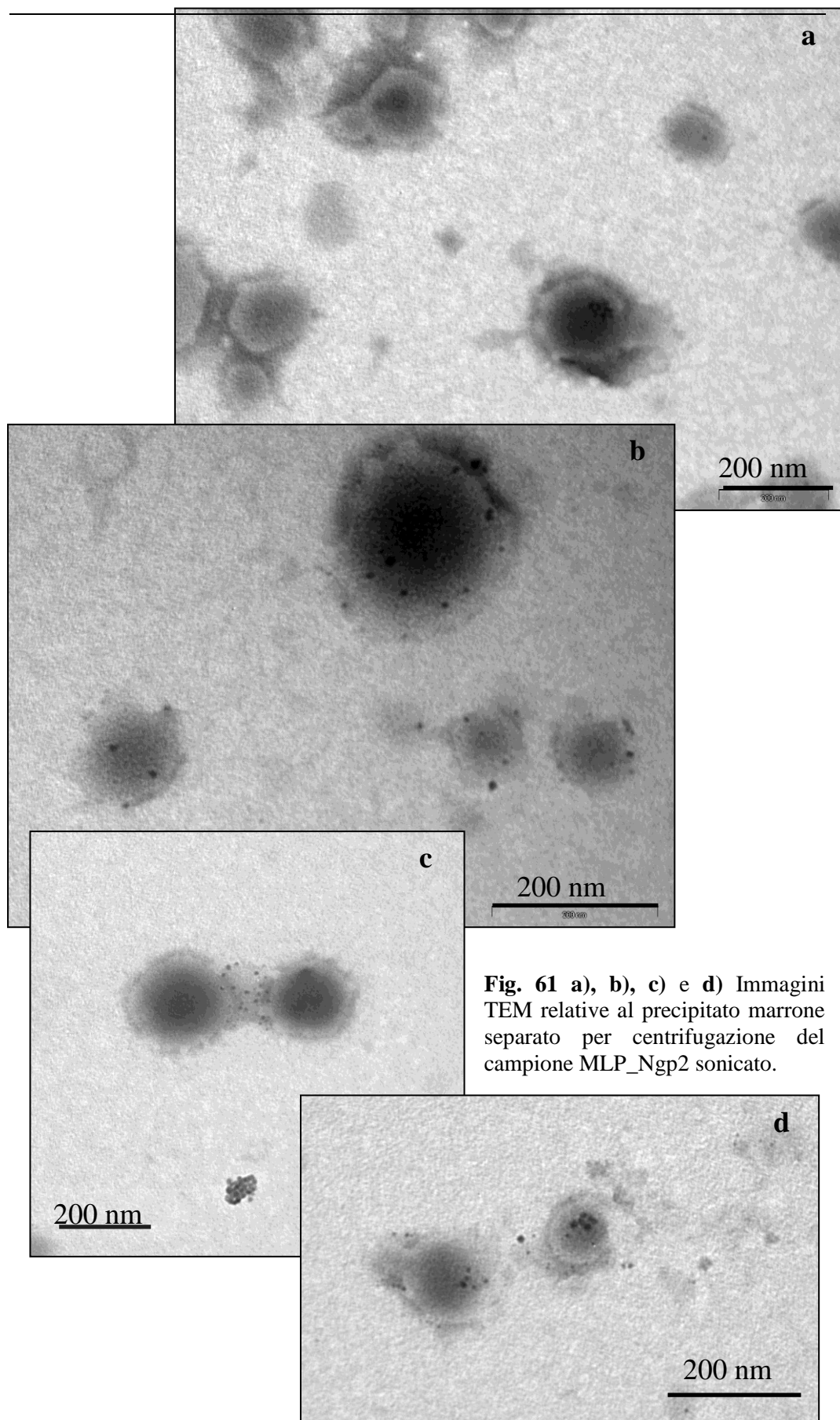
**Fig. 59** Immagine TEM relativa al surnatante separato per centrifugazione del campione MLP\_Ngp2 sonicato.

Il precipitato marrone, invece, come riportato nelle foto di Figure 60-61, è costituito prevalentemente da magnetoliposomi, nei quali si può osservare la presenza di nanoparticelle sparse nella struttura vescicolare. Tale visualizzazione non chiarisce precisamente il posizionamento delle HB\_Ngp, le quali, però, considerata la loro natura apolare, dovrebbero presumibilmente venire a trovarsi a livello dei bilayer fosfolipidici. Sono inoltre assenti nanoparticelle libere nell'ambiente circostante. Quanto osservato nelle immagini di Fig. 60-61 conferma l'ipotesi precedentemente riportata sulla composizione della fase costituita dal precipitato marrone.



**Fig. 60 a) e b)** Immagine TEM relativa al precipitato marrone separato per centrifugazione del campione MLP\_Ngp2 sonicato.

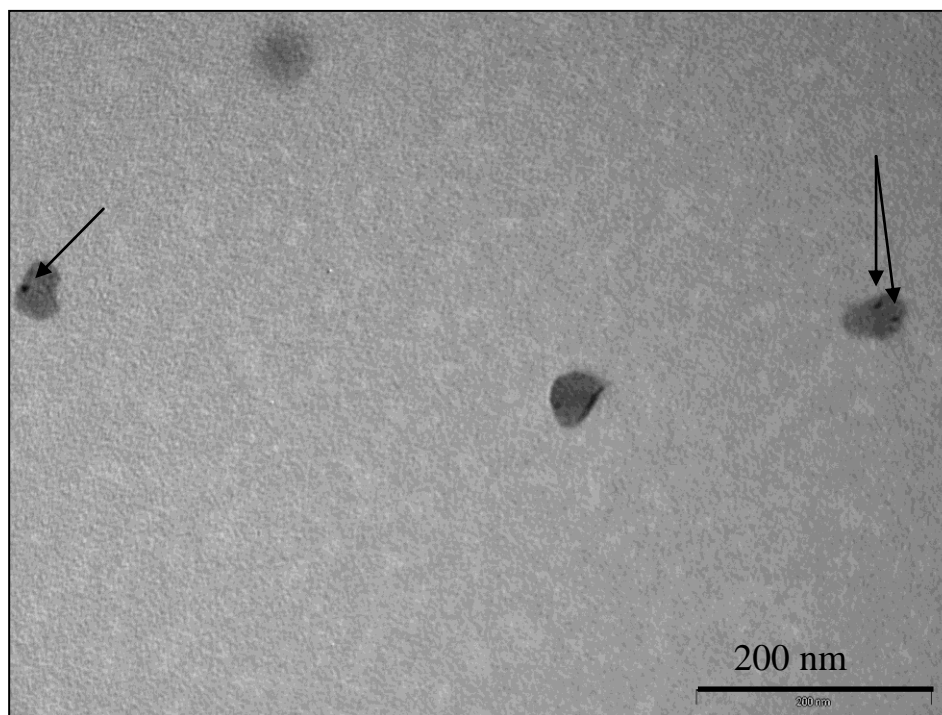




**Fig. 61 a), b), c) e d)** Immagini TEM relative al precipitato marrone separato per centrifugazione del campione MLP\_Ngp2 sonificato.

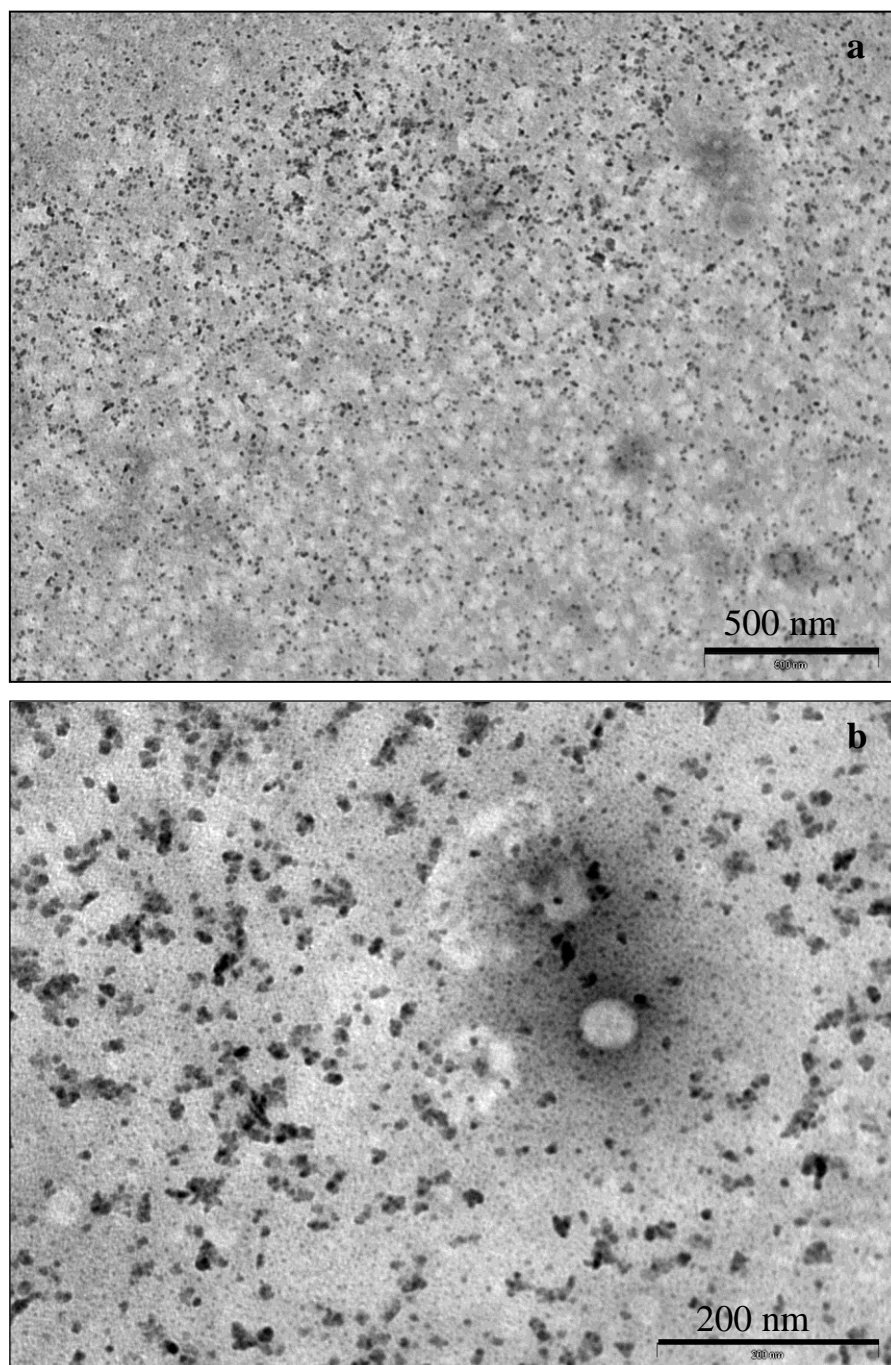
---

In alcune zone del campione sono state osservate particolari formazioni circolari di diametro intorno ai 30-50 nm, caratterizzate dalla presenza, su di esse, di alcune nanoparticelle magnetiche, come riportato nella foto di Figura 62.



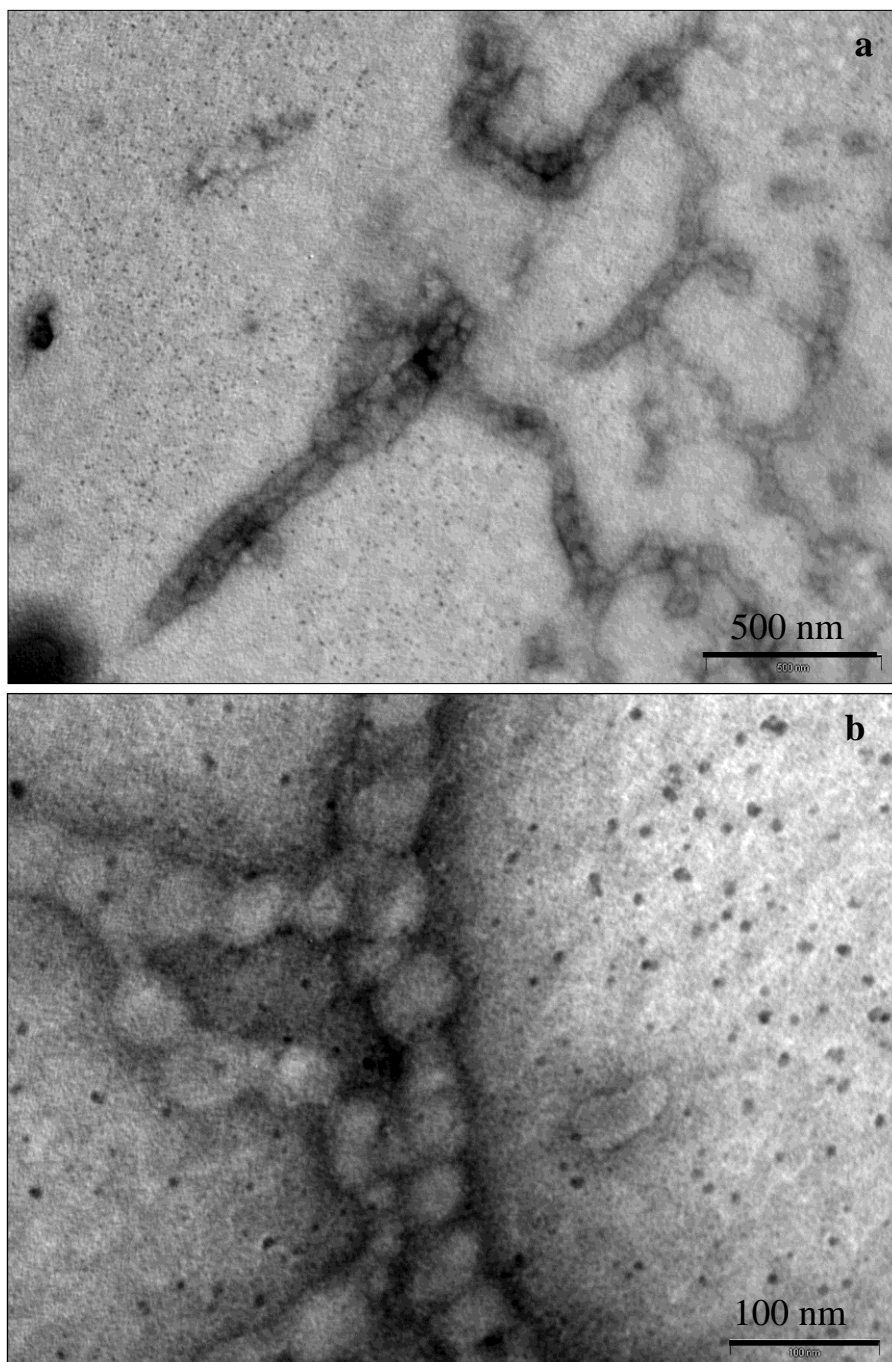
**Fig.62** Immagine TEM relativa al precipitato marrone del campione MLP\_Ngp2; si riscontra la presenza di particolari strutture circolari scure su cui sono presenti delle nanoparticelle magnetiche.

In ultimo, l'analisi TEM del precipitato scuro, sottostante al precipitato marrone, ha confermato la presenza prevalente in questa fase di magnetite libera, come riportato nelle foto di figura 63. In alcuni punti si osservano particolari strutture fosfolipidiche aggregate, che, probabilmente, data la loro pesantezza, sono andate separarsi sul fondo della vial insieme alla magnetite libera (Fig.64).



**Fig. 63 a) e b)** Immagini TEM relative al precipitato scuro del campione MLP\_Ngp2 separato per centrifugazione.





**Fig. 64 a) e b)** Immagini TEM relative al precipitato scuro del campione MLP\_Ngp2 in cui è visibile la presenza di aggregati fosfolipidici.

Lo studio TEM svolto sul campione centrifugato ha permesso di mettere in luce alcune caratteristiche del campione che si sarebbero potute apprezzare sul campione non purificato. E' facile rendersi conto, infatti, della presenza nelle 3 parti separate per centrifugazione di strutture vescicolari abbastanza differenti

---

rispetto a quelle presenti nel campione di partenza. Alla luce di ciò, sia le strutture vescicolari identificate nel campione non purificato che quelle individuate nelle fasi del surnatante e del precipitato marrone sono considerate caratterizzanti il tipo di formulazione analizzata. Inoltre, lo studio TEM ha confermato che l'ipotesi relativa alle strutture presenti nelle 3 fasi separate per centrifugazione fosse effettivamente corretta, conferendo maggiore attendibilità alla valutazione dell'associazione %  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -liposomi, basata sulla somma della magnetite contenuta nelle fasi del surnatante e del precipitato marrone.

#### 2.3.3.7.2. Conclusioni

In conclusione è possibile affermare che gli MLP\_Ngp, data la reale interazione nanoparticelle-liposomi, rappresentano dei potenziali carrier magnetici dotati di una buona stabilità nel tempo e di buone capacità di caricamento nei confronti della magnetite. L'indagine TEM del campione centrifugato ha confermato la validità del metodo di separazione delle nanoparticelle non associate ai liposomi. La fase 3, oltre che essere una fase di parziale conferma di quanto già apprezzato nelle fasi 1 e 2, è stata realizzata per migliorare ulteriormente le caratteristiche dimensionali dei sistemi vescicolari magnetici, abbandonando l'uso del bagnetto di ghiaccio durante la sonicazione.

#### 2.3.3.8. Analisi MLP\_Ngp – fase 3

Considerati i risultati promettenti ottenuti nelle fasi di studio 1 e 2 sugli MLP\_Ngp è stato deciso che sarebbero stati proprio questi i colloidi ibridi magnetici di partenza per gli esperimenti in vitro (capitolo 3). Alla luce di ciò si è ritenuto opportuno svolgere un'ulteriore fase di approfondimento mirata a confermare i risultati ottenuti nelle fasi precedenti e a migliorare ulteriormente le caratteristiche dimensionali iniziali delle strutture vescicolari.

---

#### 2.3.3.8.1. Caratterizzazione MLP\_Ngp

Nella fase 3 si è proceduto con l'esecuzione del medesimo piano di lavoro (**fase 2**) articolato in 6 formulazioni, come riportato nella tabella seguente.

**Tabella 27**

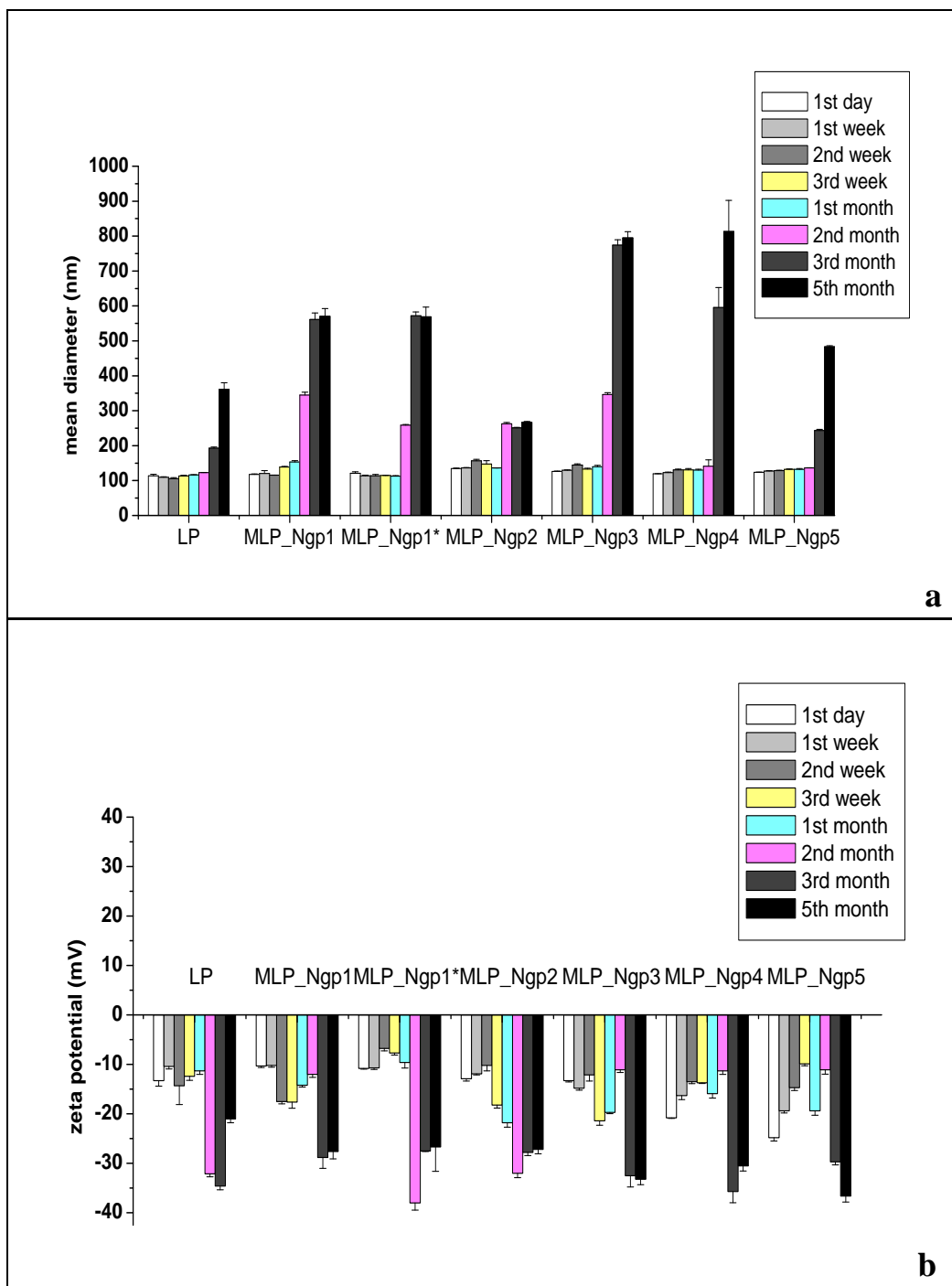
Formulazione	Conc. lipidica	Conc. HL_SPION	Conc. in HL_SPION
	mmol/L	mmol/L	mg/ml
MLP_Ngp 1	20	0,17	0,04
MLP_Ngp 1*	20	0,43	0,1
MLP_Ngp 2	20	0,86	0,2
MLP_Ngp 3	20	1,51	0,35
MLP_Ngp 4	20	2,80	0,65
MLP_Ngp 5	20	4,30	1,0

Come è possibile osservare dal grafico di figura 65 a), dove è riportato il diametro medio idrodinamico, i valori di partenza delle formulazioni sono risultati essere circa 40-50 nm inferiori rispetto a quelli ottenuti nella **fase 2**, mostrando, ancora una volta, l'importanza dei parametri di sonicazione utilizzati sul sistema vescicolare ottenuto. In questa fase i parametri applicati differiscono dai precedenti, applicati nella **fase 2**, esclusivamente per l'assenza del bagnetto di ghiaccio durante l'applicazione del trattamento. Lo sviluppo di calore durante il processo di sonicazione è risultato quindi determinante per la riduzione delle dimensioni dei sistemi vescicolari. Quanto appena detto può essere giustificato attraverso una considerazione semplice e intuitiva, relativa alla temperatura di transizione ( $T_m$ ) dei fosfolipidi. Infatti, come noto il superamento della  $T_m$  determina una maggiore fluidità del doppio strato fosfolipidico e una tendenza alla ridisposizione dello stesso. Tale maggiore libertà di movimento a livello dei bilayers fosfolipidici facilita e amplifica l'effetto di delamellarizzazione operato dalla sonicazione, inducendo la formazione di sistemi di dimensioni ridotte.

Lo sviluppo di calore, in generale, non è un effetto desiderato, in relazione soprattutto per il possibile stress per un eventuale farmaco caricato nel sistema vescicolare; inoltre, in alcuni casi, se la sonicazione è troppo intensa, e quindi

---

eccessivo anche il relativo calore sviluppato, il sistema disperso può andare incontro ad una completa rottura. La sonicazione, quindi, è una metodica ottimale se operata con dei parametri idonei al tipo di sistema trattato.



**Fig. 65** a) Diametro medio idrodinamico delle MLP\_Ngp sonicate in funzione del tempo; b) Potenziale zeta delle MLP\_Ngp sonicate in funzione del tempo.

Nel nostro caso, l'applicazione di parametri non eccessivamente stressanti, e l'ottima stabilità della magnetite, anche ad elevate temperature, ha permesso di ottenere un effetto di sonicazione nel complesso positivo.

La stabilità nel tempo delle formulazioni è risultata essere leggermente inferiore rispetto a quella verificata nella fase 2, e il diametro medio ha subito variazioni a partire dal 2°-3° mese per tutte le formulazioni.

Il potenziale zeta anche in questa fase, come nella precedente, presenta in partenza valori più negativi per le formulazioni ad elevato contenuto in magnetite (MLP\_Ngp 4 e 5). Con il trascorrere del tempo il potenziale zeta di tutte le formulazioni tende verso valori più negativi (Fig. 65 b). L'indice di polidispersione, misurato a 24 h dalla preparazione, ha mostrato dei valori indubbiamente più bassi rispetto a quelli verificati nella **fase 2**, confermando l'aumentata omogeneità del sistema ottenuto per sonicazione in assenza del bagnetto di ghiaccio. L'omogeneità del sistema viene a ridursi a partire dal 2°-3° mese, come anche verificato dal diametro medio idrodinamico (Tabella 28).

**Tabella 28**

	1 <sup>st</sup> day	1 <sup>st</sup> month	3 <sup>rd</sup> month	5 <sup>th</sup> month
<b>LP</b>	0,26 ±0,01	0,33±0,04	0,35±0,02	0,44±0,01
<b>MLP_Ngp1</b>	0,38±0,01	0,34±0,01	0,69±0,15	0,70±0,40
<b>MLP_Ngp1*</b>	0,28±0,01	0,30±0,02	0,46±0,06	0,49±0,01
<b>MLP_Ngp2</b>	0,28±0,01	0,39±0,02	0,18±0,01	0,20±0,14
<b>MLP_Ngp3</b>	0,26±0,01	0,25±0,01	0,64±0,01	0,65±0,02
<b>MLP_Ngp4</b>	0,37±0,01	0,48±0,10	0,66±0,04	0,61±0,02
<b>MLP_Ngp5</b>	0,24±0,01	0,27±0,01	0,54±0,01	0,27±0,01

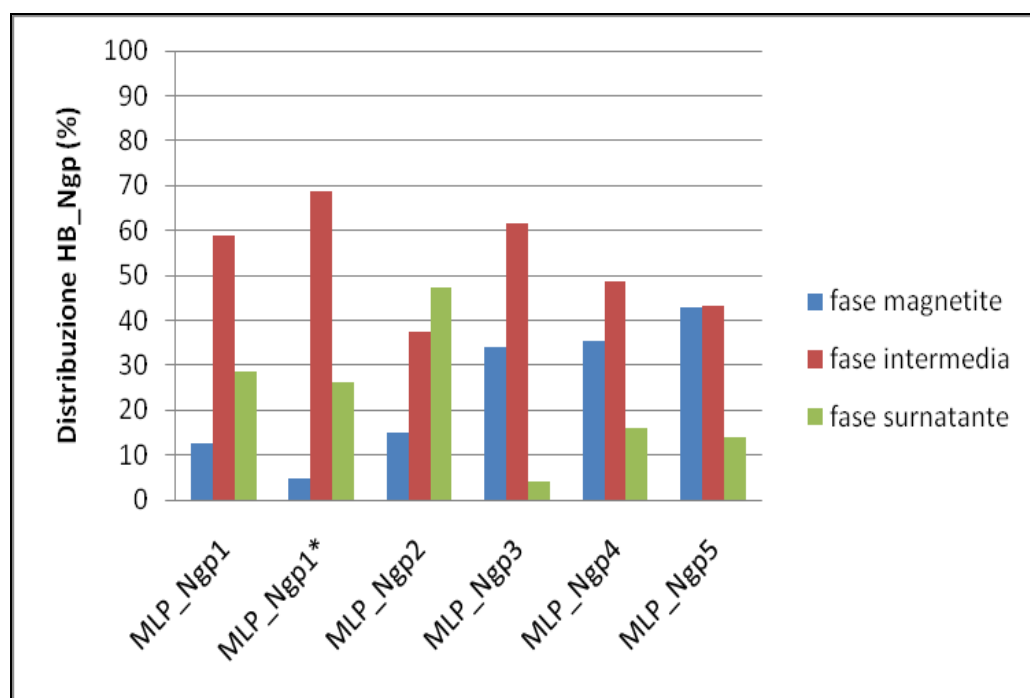
L'associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi, riportata in tabella 29, diminuisce all'aumentare della concentrazione di magnetite coinvolta come rilevato nella **fase 2**.



**Tabella 29**

<b>Campioni sonicati</b>	<b>Assoc. % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-lip centrifug.</b>
MLP_Ngp1	87,3
MLP_Ngp1*	95,2
MLP_Ngp2	84,8
MLP_Ngp3	65,8
MLP_Ngp4	73,1
MLP_Ngp5	54,2

Anche in questo caso è stata osservata la distribuzione % della magnetite nelle 3 fasi separate. Come è possibile osservare dall'andamento sul grafico di Figura 66, la quantità di magnetite presente nella fase intermedia (magnetoliposomi) decresce leggermente all'aumentare della concentrazione coinvolta, mentre si riduce visibilmente la quantità presente nel surnatante ed aumenta quasi linearmente quella nel precipitato scuro. Tale andamento è simile a quello riscontrato negli MLP\_HB e negli MLP\_Ngp della **fase 2** centrifugati.



**Fig. 66** Distribuzione % delle HB\_Ngp nelle 3 fasi separate per centrifugazione.

Infine, per valutare la possibilità di conservare i campioni liposomiali a lungo termine, è stata eseguita una prova di liofilizzazione sui campioni MLP\_Ngp 2 e 3 aggiungendo quantità crescenti di trialosio come crioprotettore.

Nella tabella seguente vengono riportati i dati DLLS dei campioni prima e dopo liofilizzazione, per ridispersione in un volume di tampone uguale a quello di partenza.

**Tabella 30**

	PRE LIOFILIZ.	POST LIOFILIZ. 1 mg/mg P90*	POST LIOFILIZ. 1,5 mg/mg P90*	POST LIOFILIZ. 2 mg/mg P90*
LP	100,1	140,9	102,4	108,1
MLP_HL2	130,25	186,3	128,2	120,4
MLP_HL3	151,35	203,9	173,1	164,3

\*mg di trialosio per mg P90

Come era stato già osservato nel caso degli MLP\_HL, anche per gli MLP\_Ngp l'aggiunta di 2 mg di trialosio per mg di P90 utilizzato sembra essere sufficiente a mantenere costanti le dimensioni del campione di partenza.

Considerato l'esaustivo studio TEM svolto nella **fase 2** non è stato ritenuto necessario sottoporre ad ulteriore analisi le formulazioni MLP\_Ngp della **fase 3**.

#### 2.3.3.8.2. Conclusioni

La fase 3 ha confermato la ripetibilità delle formulazioni MLP\_Ngp. I risultati ottenuti nelle fasi 2 e 3, svolte con lo stesso programma di lavoro, sono risultati infatti paragonabili. Inoltre, in questa fase sono state meglio definite alcune specifiche operazionali, quali l'applicazione della sonicazione in assenza del bagnetto di ghiaccio, ed alcuni aspetti supplementari quali la versatilità dei sistemi vescicolari magnetici nei confronti del processo di liofilizzazione. Nel complesso le formulazioni MLP\_Ngp hanno presentato buone potenzialità come carrier magnetici, sia dal punto di vista morfologico che strutturale, sia per le capacità di caricamento della magnetite. Tenendo conto di questi risultati gli

---

MLP\_Ngp sono stati scelti per i test di citotossicità riportati nel capitolo successivo.

#### *2.3.4. Valutazioni conclusive generali*

Lo studio di caratterizzazione svolto sugli MLP\_HL, MLP\_HB ed MLP\_Ngp offre una panoramica generale abbastanza esaustiva sul tipo di nanocolloidi ibridi magnetici ottenuti nei 3 diversi casi. Osservando da un punto di vista critico il lavoro svolto è probabile che esso risulti a tratti troppo articolato e talvolta ripetitivo, tuttavia, l'elaborazione in più stadi della sperimentazione, su ciascun tipo di magnetite coinvolta, è stato l'unico percorso ragionevole capace di condurre gradatamente ad uno studio il più completo possibile. Il principio seguito è stato infatti quello di sviluppare il progetto strada facendo, sulla base dei risultati ottenuti in ciascuna fase, cercando di trovare risposte agli interrogativi, di risolvere le problematiche e dando spazio, ove possibile, a idee innovative o stimolanti per il progetto d'interesse.

Mettendo insieme i risultati relativi ai tre tipi di sistemi vescicolari magnetici ottenuti è possibile esprimere un parere complessivamente positivo in relazione al fatto che, in tutti i casi, si può parlare di magnetoliposomi dotati di un elevato grado di associazione alla magnetite e di una discreta stabilità nel tempo. Alcuni fattori ricorrenti e su cui è possibile esprimere una valutazione generale riguardano la stabilità delle formulazioni al crescere della magnetite coinvolta e l'effetto della sonicazione. In linea generale, al crescere della quantità di magnetite coinvolta (in particolare alle concentrazioni di 0,65-1 mg/ml) le formulazioni sono risultate meno stabili nel tempo, soprattutto gli MLP\_HB. Inoltre, è stato osservato che, paragonando per semplice analisi visiva, le formulazioni non sonicate e sonicate dopo 3-5-8 mesi dalla preparazione, le prime sono risultate omogeneamente ridispersibili per semplice agitazione manuale (nonostante l'elevato indice di polidispersione e l'elevato diametro idrodinamico), mentre, le seconde hanno presentato spesso aggregati (caratterizzati sia da magnetite che da materiale fosfolipidico) e un'alterazione del sistema che impedisce una omogenea ridispersione. Quanto appena detto sottolinea la maggiore instabilità a lungo termine dei sistemi sonicati e va a

---

---

confermare quanto già noto relativamente all'effetto dell'aumentata area superficiale totale di un sistema disperso (nel nostro caso conseguente al processo di sonicazione), la quale, comportando l'aumento dell'energia libera di superficie, porta ad un sistema termodinamicamente più instabile. Inoltre, l'aspetto messo in luce nel sottoparagrafo 2.3.3.7.1. (fig. 54), abbastanza comune a tutte le formulazioni preparate, sottolinea la maggiore lentezza di sedimentazione dei sistemi sonicati, fenomeno che comporta la formazione di un sedimento più compatto, caratterizzato da uno stretto contatto interparticellare, che, con il passare del tempo, può divenire difficilmente risospensibile. La sonicazione quindi, nonostante conduca a dei sistemi vescicolari più omogenei e di ridotte dimensioni, comporta, a lungo termine una minore stabilità. Anche il potenziale zeta delle formulazioni con valori inferiori ai -30mV, può essere una valida giustificazione ai fenomeni di aggregazione e alterazione verificatisi. Nonostante ciò, la comprovata stabilità delle dispersioni magnetiche sonicate per un tempo variabile tra i 3 e i 5 mesi risulta essere complessivamente un risultato piuttosto soddisfacente soprattutto se confrontato con le comuni formulazioni liposomiali. L'applicazione della liofilizzazione sulle dispersioni sonicate potrebbe permetterne una conservazione più prolungata.

### *2.3.5. Conclusioni e propositi futuri*

L'aspetto più interessante e coinvolgente del progetto di ricerca portato avanti è stato il confronto tra i sistemi vescicolari magnetici ottenuti a partire da 3 tipi di magnetite differenti. In particolare, è importante sottolineare la diversità delle 3 strutture magnetoliposomiali ottenute e l'assenza in letteratura di precedenti simili configurazioni strutturali in relazione ai tipi di magnetite utilizzate. Infatti, riguardo gli MLP\_HL, sono assenti precedenti studi su magnetoliposomi le cui nanoparticelle idrofiliche siano andate a posizionarsi sulla superficie esterna liposomiale; mentre, per quanto riguarda gli MLP\_HB e gli MLP\_Ngp risultano essere del tutto assenti precedenti studi di caratterizzazione riguardanti magnetoliposomi preparati con nanoparticelle di tipo idrofobico. Tale condizione ha stimolato notevolmente l'interesse sul progetto di ricerca, il quale

---

al contempo si è venuto spontaneamente a caricare di un buon grado di originalità.

Tra i propositi futuri si riconosce sicuramente la possibilità di intervenire al fine di migliorare le caratteristiche generali dei colloidi ibridi magnetici preparati, nonché quella di studiare più a fondo l'interazione magnetite-liposomi a seconda del tipo di stabilizzazione posseduta dalla magnetite stessa. Inoltre, un importante studio che non è stato possibile eseguire durante il periodo di ricerca appena conclusosi, ma che sarebbe di notevole interesse svolgere in futuro, è quello relativo alle misure magnetiche delle formulazioni vescicolari preparate, al fine verificarne l'effettiva possibile utilità *in vivo* per lo sfruttamento di un targeting fisico verso un sito specifico. In ultimo, essendo stato possibile svolgere le prove *in vitro* solo sugli MLP\_Ngp, un buon proposito futuro sarebbe quello di eseguire le prove *in vitro* anche sugli MLP\_HL e gli MLP\_HB, nonché gli esperimenti *in vivo* sui sistemi vescicolari magnetici ritenuti più idonei.

---

### ***Ringraziamenti***

Lo sviluppo del progetto sui magnetoliposomi è stato per me un percorso tortuoso, a volte in salita, ma, al contempo, ricco di tante soddisfazioni; lo spirito principale è stato quello di compiere un passo dopo l'altro al fine di raggiungere un obiettivo sempre migliore, camminando spesso nell'incertezza ma mai perdendo la forza per andare avanti. In questa strada sono stata spesso sola e per questo, forse, ho cercato di dare davvero il meglio di me, ma un progetto di ricerca per andare avanti ha bisogno di tanti input, di tante persone, e per questo non ho mai smesso di girarmi intorno e fare di tutto per mantenere vive le collaborazioni e crearne di nuove. Alla fine di questi tre anni, quindi, ci tengo a ringraziare le persone con cui ho condiviso e fatto crescere questo piccolo grande progetto:

Ringrazio la Dott.ssa Carla Cannas, il Dott. Andrea Ardu, la Dott.ssa Federica Orrù e la Prof. Anna Musinu del *Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Cagliari*.

Ringrazio la Dott.ssa Francesca Marongiu del *Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico*, la Dott.ssa Alessandra Scano e il Prof. Guido Ennas del *Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Cagliari* e il Prof. M. Arturo López-Quintela del *Dipartimento di Chimica Fisica dell'Università di Santiago de Compostela (Spagna)*, nonché il personale tecnico dell'unità spagnola gentilmente prestatosi alle analisi TEM.

Ringrazio la Prof. Anna Maria Maccioni e il Prof. Carlo Anchisi per la disponibilità offerta per lo svolgimento dei saggi del ferro nei loro laboratori, nonché la Dott.ssa Maria Cristina Meloni per il supporto morale offertomi.

In ultimo, ringrazio la Prof.ssa Chiara Sinico e la Prof.ssa Anna Maria Fadda per la fiducia prestatami.

---

## Bibliografia

- 1 R. Massart, IEEE Trans. Magn. 17 (1981) 1247.
- 2 S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P.M. Rice, S.X. Wang, G. Li, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004), 273.
- 3 Sun, S. Zeng, H. *Size-Controlled Synthesis of Magnetite nanoparticles J. Am.Chem. Soc.* 124 (2002), 8204-8205.
- 4 H. Kiwada, J. Sato, S. Yamada, Y. Kato, *Feasibility of Magnetic Liposomes as a Targeting Device for Drugs Chem. Pharm. Bull.* 34 (10) (1986), 4253-4258.
- 5 M. S. Martina, J.P. Fortin, C. Mènager, O. Clément, G. Barratt, C. G. Madelmont, F. Gazeau, V. Cabuil, S.Lesieur, *Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005), 10677-10682.
- 6 M. S. Martina, C. Wilhelm, S. Lesieur, *The effect of magnetic targeting on the uptake of magnetic-fluid-loaded liposomes by human prostatic adenocarcinoma cells Biomaterials* 29 (2008), 4137–4145.
- 7 M.S. Martina, V. Nicolas, C. Wilhelm, C. Menager, G. Barratt, S. Lesieur, *The in vitro kinetics of the interactions between PEG-ylated magnetic-fluid-loaded liposomes and macrophages Biomaterials* 28 (2007), 4143-4153.
- 8 S.J.H. Soenen, E. Illyes, D. Vercauteren, K. Braeckmans, Z. Majer, S. C. De Smedt, M. De Cuyper, *The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes Biomaterials* 30 (2009), 6803–6813.
- 9 S.J.H. Soenen, A.R. Brisson, M. De Cuyper, *Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: The magnetoliposome model Biomaterials* 30 (2009), 3691–3701.
- 11 L. Zhu, Z. Huo, L.Wang, X. Tong, Y. Xiao, K. Ni, *Targeted delivery of methotrexate to skeletal muscular tissue by thermosensitive magnetoliposomes International Journal of Pharmaceutics* 370 (2009), 136–143.
- 12 E. Viroonchatapan, H. Sato, M. Ueno, I. Adachi, K. Tazawa, I. Horikoshia, *Magnetic targeting of thermosensitive magnetoliposomes to mouse livers in an in situ on line perfusion system International Journal of Pharmaceutics* 370 (2009), 136–143.
- 13 H. Nobuto, T. Sugita, T. Kubo, S. Shimose, Y. Yasunaga, T. Murakami, M. Ochi, *Evaluation of systemic chemotherapy with magnetic liposomal doxorubicin and a dipole external electromagnet Int. J. Cancer* 109 (2004), 627–635.
- 13 X. Zheng, J. Lu, L. Deng, Y. Xiong, J. Chen, *Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery International Journal of Pharmaceutics* 366 (2009), 211–217.

- 
- 14** De Cuyper, M.; Joniau, M. *Magnetoliposomes: formation and structural characterization*; European Biophysics Journal, 15 (1988), 311-319.
- 15** C. Rivière, M.S. Martina, Y. Tomita, C. Wilhelm, A. Tran Dinh, C. Me´nager, E. Pinard, S. Lesieur, F. Gazeau, J. Seylaz, *Magnetic Targeting of Nanometric Magnetic Fluid-loaded Liposomes to Specific Brain Intravascular Areas: A Dynamic Imaging Study in Mice* Radiology: Volume 244: Number 2 (August 2007).
- 16** J.P. Fortin-Ripoche, M.S. Martina, F. Gazeau, C. Me´nager, C. Wilhelm, J. C. Bacri, S. Lesieur, O. Cle´ment, *Magnetic Targeting of Magnetoliposomes to Solid Tumors with MR Imaging Monitoring in Mice: Feasibility* Radiology: volume 239: Number 2 (May 2006).
- 17** Determinazione del Ferro mediante 1,10 fenantrolina “Colorimetria e Spettrofotometria” Vogel Cap 17 (1995), 778-779.
- 18** R. Sabate, R. Barnadas-Rodriguez, J. Callejas-Fernandez, R. Hidalgo-Alvarez, J. Estelrich, *Preparation and characterization of extruded magnetoliposomes* International Journal of Pharmaceutics 347 (2008), 156–162.
- 19** <http://www.alfatest.net/listing.asp?CatID=200>
- 20** L. Zhang, S. Granick, How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles) Nanoletters vol.6 n°4 (2006), 694-698.



---

---

---

### **3. Studi in vitro sui magnetoliposomi**

#### **3.1. Scopo del lavoro**

Lo scopo principale del lavoro sperimentale riportato nel seguente capitolo è stato quello di andare a verificare, mediante lo svolgimento dei saggi di citotossicità, la biocompatibilità delle nanoparticelle di magnetite Nanogap e dei relativi magnetoliposomi preparati.

Nel capitolo 2, sottoparagrafi 2.3.3.6-2.3.3.7-2.3.3.8, è possibile analizzare gli studi preliminari di caratterizzazione svolti sui sistemi vescicolari magnetici preparati con le HB\_Ngp.

Ciò che differenzia principalmente i magnetoliposomi preparati in questa fase da quelli realizzati nelle fasi precedenti di questo studio, è il grado di purezza del fosfolipide utilizzato.

Data l'intenzione di applicare i sistemi vescicolari alle cellule, è stato ritenuto opportuno sostituire il classico P90 utilizzato nella prima fase della ricerca con un fosfolipide ad elevato grado di purezza. Inoltre, al fine di ottenere dei magnetoliposomi a lunga circolazione, o cosiddetti 'Stealth', il fosfolipide principale è stato miscelato con un opportuno fosfolipide peghilato.

In questo caso, diversamente da quanto riportato nel capitolo 2, si è scelto di preparare la sola formulazione con il più alto contenuto in magnetite, denominata MLP\_Ngp5<sub>cell</sub>, con la quale sono stati eseguiti gli studi di citotossicità.

---

### **3.2. Parte sperimentale**

#### **3.2.1. Materiali**

La L-R fosfatidilcolina d'uovo dispersa in cloroformio (EPC, PM 760,08) e l'1,2-diacil-SN-glicerolo-3-fosfoetanolamina-N[metossi(poli(etilenglicole))-2000] (DSPE-PEG2000, PM 2805,54) utilizzati per la preparazione dei liposomi e dei magnetoliposomi sono stati forniti dall'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Le nanoparticelle idrofobiche di magnetite NANOGAP<sup>®</sup>, disperse in cloroformio, sono state gentilmente fornite dalla NANOGAP<sup>®</sup>SUBnmPARTICLES (Santiago de Compostela, Spagna).

Il tampone fosfato a pH 7 è stato fornito dalla Carlo Erba Reagenti; l'idrossilamina cloridrato, l'1-10 fenantrolina monoidrata, l'idrossido di sodio (pastiglie), l'acido cloridrico (37%), l'acido citrico, il sodio citrato tribasico diidrato, l'etanolo (96%), il solfato di alluminio, il Nuclear Fast Red e il potassio esacianoferrato sono stati forniti dalla Sigma Aldrich (Germania).

Per la preparazione delle soluzioni acquose è stata utilizzata acqua deionizzata.

I saggi di citotossicità dei liposomi e dei magnetoliposomi sono stati effettuati sulla linea cellulare CCRF-CEM, cellule leucemiche T umane, fornite dalla ATCC (Rockville, MD) e mediante l'utilizzo di piastre per coltura fornite dalla Falcon (Milano, Italia).

#### **3.2.2. Preparazione dei liposomi e dei magnetoliposomi**

La preparazione dei sistemi vescicolari è stata svolta utilizzando vetreria sterilizzata. Il volume delle formulazioni preparate è stato sempre di 5 ml totali; il mezzo di idratazione è stato il tampone fosfato a pH 7, opportunamente sterilizzato per filtrazione. Le formulazioni sono state sottoposte ad un processo di sonicazione caratterizzato dall'applicazione di 10 cicli di sonicazione di 30 secondi intervallati da 30 secondi di pausa.

La concentrazione di magnetite prescelta per la formulazione da applicare alle cellule è stata quella di 1 mg/ml, corrispondente alla formulazione MLP\_Ngp5 del capitolo 2.

I liposomi e i magnetoliposomi sono stati preparati con fosfatidilcolina d'uovo (PC) e 1,2-diacil-SN-glicerolo-3-fosfoetanolamina-N[metossi(poli (etilenglicole))]-

---

---

2000], miscelati in rapporto molare 95:5 (%), attraverso la metodica della Thin Layer Evaporation (TLE).

Riassumendo, la fosfatidilcolina d'uovo e le nanoparticelle Nanogap, già disperse in cloroformio, sono state unite al cloroformio utilizzato per la dispersione del fosfolipide peghilato; il solvente organico è stato di seguito evaporato sottovuoto a 40°C, mediante l'utilizzo di un evaporatore rotante (Rotavapor R110, Büchi). Il film sottile lipidico ottenuto è stato posto sottovuoto per 24 h e di seguito idratato in modo da ottenere una concentrazione lipidica finale di 20 mmol L<sup>-1</sup>, sotto agitazione meccanica alla velocità di 2000 rpm/min. per 1 h. La formulazione ottenuta è stata di seguito sottoposta al processo di sonicazione.

### *3.2.3. Caratterizzazione dei magnetoliposomi*

#### *3.2.3.1. DLLS, indice di polidispersione, potenziale zeta e analisi morfologica (TEM).*

Il diametro medio, l'indice di polidispersione e il potenziale zeta delle vescicole, magnetiche e non magnetiche, sono stati misurati con lo strumento Zen3600 Nanosizer ZS della Malvern, seguendo la medesima procedura indicata nel sottoparagrafo 2.2.9.1.. L'analisi morfologica delle nanoparticelle magnetiche Nanogap e dei relativi magnetoliposomi è stata condotta presso il Dipartimento di Chimica Fisica dell'Università di Santiago de Compostela (Spagna). Le nanoparticelle magnetiche e i magnetoliposomi sono stati caricati su grigliette rame/carbonio secondo la procedura indicata nel sottoparagrafo 2.2.9.2..

#### *3.2.3.2. Saggio della o-fenantrolina sui magnetoliposomi*

Il saggio sui magnetoliposomi è stato condotto secondo il seguente protocollo: a 0,1 mL di dispersione di magnetoliposomi sono stati aggiunti 0,5 ml di HCl conc. Di seguito sono stati aggiunti 0,5 mL di idrossilamina cloridrato (10% p/v); per neutralizzare il pH acido della miscela sono stati poi aggiunti 0,5 ml di NaOH 12 mol L<sup>-1</sup> e 1,2 ml di tampone citrato. La complessazione degli ioni ferrosi è stata realizzata mediante l'aggiunta di 0,7 ml di fenantrolina (0,15 %

---

---

p/v). Infine è stata aggiunta una quantità di etanolo sufficiente a raggiungere il volume finale di 10 ml.

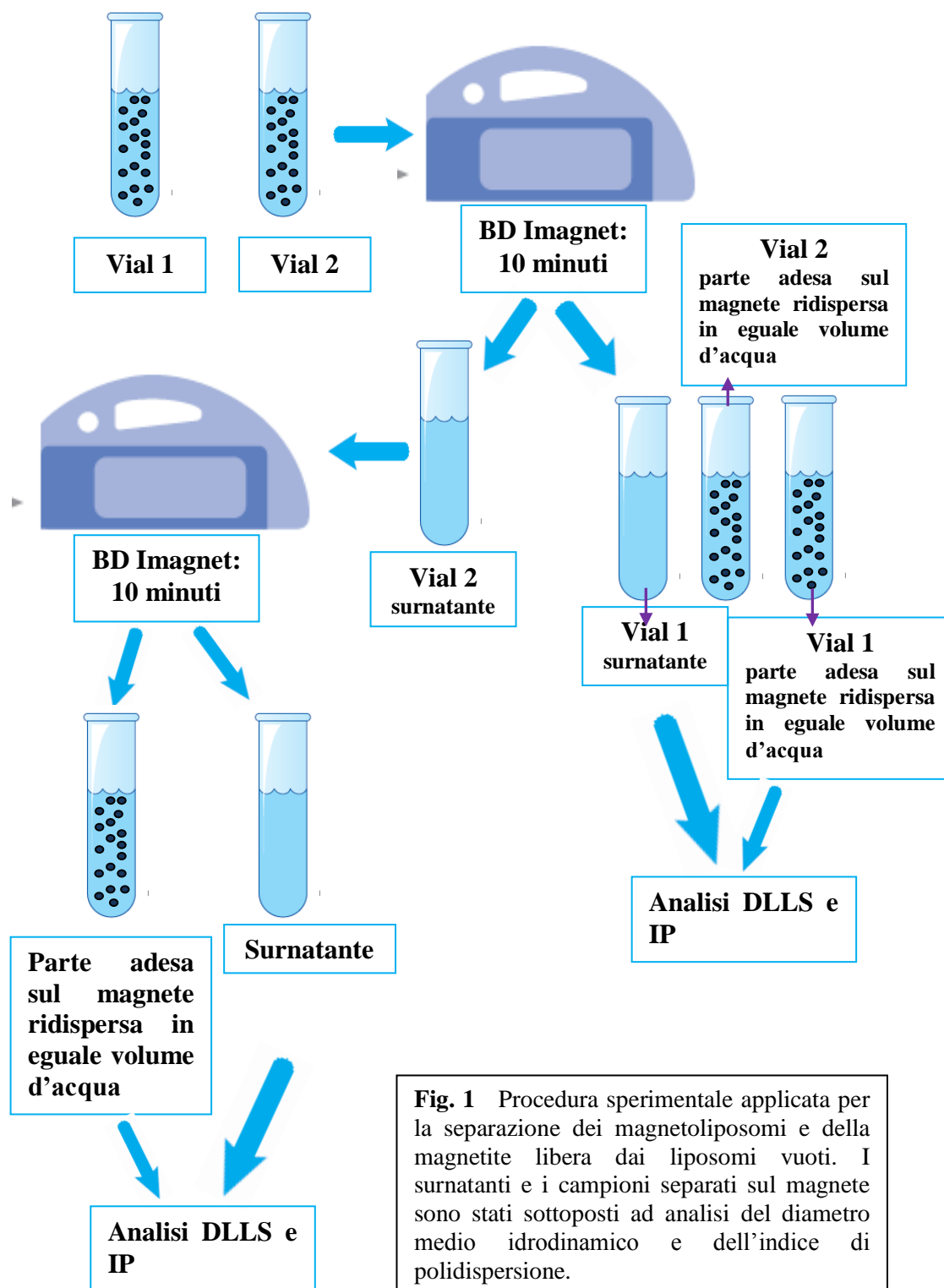
### *3.2.3.3. Valutazione della separazione dei magnetoliposomi e della magnetite mediante l'utilizzo di un magnete permanente.*

Data l'impossibilità di eseguire degli studi di magnetoforesi o di valutazione del potenziale magnetico sui magnetoliposomi preparati, è stato ritenuto utile e interessante effettuare delle semplici prove di verifica della risposta dei magnetoliposomi all'applicazione di un campo magnetico, mediante l'utilizzo di un magnete permanente. Questa procedura potrebbe essere impiegata con successo anche per la separazione dei liposomi vuoti dai magnetoliposomi e dalla magnetite libera presenti nella formulazione, o come fase preliminare alla centrifugazione, per ottenere un campione finale contenente solo magnetoliposomi.

Il magnete da noi utilizzato è destinato in realtà ad un uso differente, ovvero alla separazione di specifiche popolazioni cellulari da altre, invece, indesiderate; il processo di purificazione, in questo caso, può procedere in due modi: 1) rendendo magnetiche tutte le entità indesiderate e allontanandole quindi mediante il magnete, 2) rendendo magnetiche le cellule di interesse, mediante l'utilizzo di specifici anticorpi monoclonali magnetici, e separandole per adesione al magnete.

Nello specifico, il magnete utilizzato è stato il BD™ Imagnet (BD Biosciences, USA), caratterizzato da 6 postazioni per falcon di dimensioni 12x75 mm e 2 postazioni per falcon da 17x100 mm.

Nel nostro esperimento, un campione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> è stato diluito 1:100 in acqua e posto in 2 vial da 12x75 mm; di seguito si è proseguito secondo la procedura indicata in figura 1.



**Fig. 1** Procedura sperimentale applicata per la separazione dei magnetoliposomi e della magnetite libera dai liposomi vuoti. I surnatanti e i campioni separati sul magnete sono stati sottoposti ad analisi del diametro medio idrodinamico e dell'indice di polidispersione.

---

### 3.2.4. *Colture cellulari*

Le cellule CEM (human T cell leukaemia), scelte per i saggi di citotossicità, riflettono al meglio le condizioni reali presenti a livello del sistema circolatorio, dove le cellule del sangue sono quelle che per prime vengono a stretto contatto con le nanoparticelle iniettate nel circolo venoso nei trattamenti *in vivo*. Inoltre, trattandosi di colture cellulari in sospensione, risultano meno influenzate dai fenomeni di sedimentazione delle nanoparticelle usate, a differenza di altre linee cellulari che, seppur comunemente utilizzate per tali indagini, crescono in adesione ad un substrato, come avviene per i macrofagi J774.<sup>1,2</sup>

La CEM sono state seminate in piastre per coltura cellulare T75 e mantenute in crescita esponenziale (tra  $2 \times 10^5$  cells/mL and  $1.5 \times 10^6$  cells/mL) a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura utilizzato è stato l'RPMI 1640, supplementato al 10% con siero fetale (FCS), streptomicina (100mg/ml) e penicillina (100U/ml),

### 3.2.5. *Saggi di citotossicità*

Per la valutazione della citotossicità della magnetite e dei relativi magnetoliposomi si è deciso di eseguire in parallelo sia il saggio del trypan blue che il saggio del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT). Nonostante ciò, in conseguenza di alcune valutazioni preliminari sui risultati ottenuti dall'MTT test, è stato ritenuto opportuno, in questa sede, trattare esclusivamente il saggio del trypan blue ed i relativi risultati.

Tali valutazioni preliminari hanno messo in luce, infatti, una possibile non attendibilità dell'MTT test per la stima della vitalità cellulare in presenza di liposomi, i quali sembrerebbero interferire fortemente sul meccanismo del saggio. Alla base di tali valutazioni, attualmente oggetto di studio e approfondimento, vi sarebbero il carattere apolare dell'MTT e la sua elevata affinità per i substrati idrofobici citoplasmatici;<sup>3</sup> i liposomi, quindi, per la loro natura lipidica, potrebbero interferire fortemente sul test, alterando in modo sostanziale la valutazione della vitalità cellulare.

---

#### 3.2.5.1. *Saggio del Trypan Blue*

Il trypan blue è un colorante che, aggiunto ad una sospensione cellulare, è in grado di attraversare soltanto le membrane cellulari la cui integrità è stata modificata in modo significativo. Questo marker, quindi, penetrando soltanto nelle cellule la cui vitalità è stata compromessa, permette la visualizzazione esclusiva delle cellule danneggiate, rendendole di colore blu al microscopio ottico. Le cellule vive, invece, appaiono perfettamente sferiche e di colore giallo. Tale distinzione permette di fare una conta precisa delle cellule vive e delle cellule morte presenti nel campione analizzato.

Inizialmente le cellule sono state diluite e seminate in piastre da 12 alla concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/mL. In seguito alla diluizione, prima dei trattamenti con i magnetoliposomi, le cellule sono state incubate per 24 h. Successivamente, le dispersioni dei liposomi e dei magnetoliposomi sono state aggiunte al mezzo di coltura nei rapporti 1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000, in modo da ottenere le concentrazioni finali in magnetite rispettivamente pari a 10.30, 3.72, 1.86 e 0.93  $\mu\text{g/mL}$ . La durata dei trattamenti è stata di 0 (baseline), 24, 48 e 72 h. Ad ogni intervallo di tempo e per ciascun trattamento, il numero di cellule vive è stato determinato in triplicato attraverso la colorazione del trypan blue (TB), mediante l'utilizzo di una camera di Bürker.

#### 3.2.6. *Visualizzazione del ferro internalizzato nelle cellule: saggio del Blu di Prussia*

Lo ione ferrico reagendo con il ferrocianuro di potassio dà luogo alla formazione dell'esacianoferrato ferrico di colore blu brillante, comunemente chiamato Blu di Prussia.

Il saggio del Blu di Prussia viene applicato sia per la visualizzazione dell'uptake cellulare delle nanoparticelle magnetiche (o dei loro derivati) <sup>4</sup> su linee cellulari <sup>5,6</sup> che per l'analisi istologica di tessuti, ex vivo, venuti a contatto con nanoparticelle magnetiche (o loro derivati).<sup>7,8</sup> Le differenze principali che caratterizzano la linea cellulare da noi trattata dalla generalità degli altri casi sono relative soprattutto allo stato in sospensione e alle ridotte dimensioni delle

---



---

cellule CEM; condizioni che, nell'insieme, hanno determinato l'insorgenza iniziale di alcune problematiche relative alla visualizzazione del campione, e delle relative colorazioni, al microscopio ottico. Ciò nonostante, mediante la metodica di seguito riportata, messa a punto dai ricercatori del Dip. di Scienze e Tecnologie Biomediche, Sezione di Patologia Sperimentale, è stato comunque possibile osservare i campioni sottoposti al saggio.

In tutti gli esperimenti le CEM sono state seminate in piastre ad una densità di  $1.0 \times 10^6$  cellule/mL e fatte crescere per 24 h. Trascorso tale lasso di tempo le cellule sono state incubate per 2 h a 37°C con i magnetoliposomi e con la sola magnetite in modo da ottenere una concentrazione finale in HB\_Ngp in entrambi i casi pari a 155 µg/mL. Di seguito, le cellule sono state lavate con PBS, in maniera tale da eliminare i magnetoliposomi o la magnetite non internalizzati, e risospese in FCS. Una goccia della sospensione cellulare in FCS è stata di seguito posta all'estremità di un vetrino e strisciata mediante l'utilizzo di un altro vetrino orientato circa a 25-45°; lo striscio ottenuto è stato lasciato asciugare all'aria e di seguito posto per qualche minuto in metanolo per la fissazione. Il vetrino è stato di seguito immerso nella miscela ferrocianuro di potassio-acido cloridrico per 30 minuti. Successivamente, il vetrino è stato lavato e posto a contatto con il Nuclear Fast Red (NFR) per 5 minuti, al fine di rendere visibile la cellula ed in particolare i nuclei, che vengono a colorarsi di rosa scuro. Terminata la procedura il vetrino è stato risciacquato, fatto asciugare e posto per la visualizzazione sul microscopio ottico (microscopio Zeiss-Jena light con obiettivo 25x e 60x a immersione). Le immagini sono state acquisite mediante una CCD camera Moticam2000.

### *3.2.7. Saggio della o-fenantrolina sulle cellule*

La valutazione quantitativa dell'uptake cellulare in magnetite è stato eseguito mediante applicazione del saggio della o-fenantrolina su un pellet di cellule precedentemente incubato con magnetoliposomi. L'esperimento è stato condotto anche su una formulazione di liposomi privi di magnetite, impiegata come bianco.

---

In dettaglio, 5 ml di cellule alla concentrazione di  $1,5 \times 10^6$  cellule/mL sono stati incubati con 1 ml di magnetoliposomi alla concentrazione di 0,93 mg/ml in magnetite, ottenendo una concentrazione finale in magnetite pari a 0,155 mg/ml. Trascorse 2 h le cellule sono state fissate con paraformaldeide e diluite sino a 14 ml con tampone; si è quindi proceduto con l'esecuzione di una blanda centrifugazione, con allontanamento del surnatante e risospensione in nuovi 14 ml di tampone, per 2 volte. Questi lavaggi sono stati eseguiti per allontanare i magnetoliposomi che non sono andati ad interagire con le cellule. Al termine, è stata eseguita un'ultima centrifugazione, per formare un pellet concentrato di cellule sul quale è stato eseguito il saggio della *o*-fenantrolina.

Per l'esecuzione del saggio tutti i componenti sono stati aggiunti direttamente al pellet di cellule; avendo ottenuto delle miscele finali limpide non è stato ritenuto necessario trattare preventivamente le cellule con DMSO, ma bensì sufficiente l'utilizzo dei componenti del saggio stesso.

Il saggio quindi è stato condotto con le stesse modalità indicate nel sottoparagrafo 3.2.3.2., a differenza del fatto che non si è partiti dai 0,1 ml di magnetoliposomi ma bensì dal pellet di cellule.

---

### 3.3. Risultati e discussione

#### 3.3.1. Caratterizzazione $Lp_{cell}$ ed $MLP\_Ngp5_{cell}$

Le formulazioni preparate in questa fase sono due, i liposomi privi di magnetite e i magnetoliposomi alla concentrazione di 1 mg/ml in magnetite, come riportato nella tabella 1.

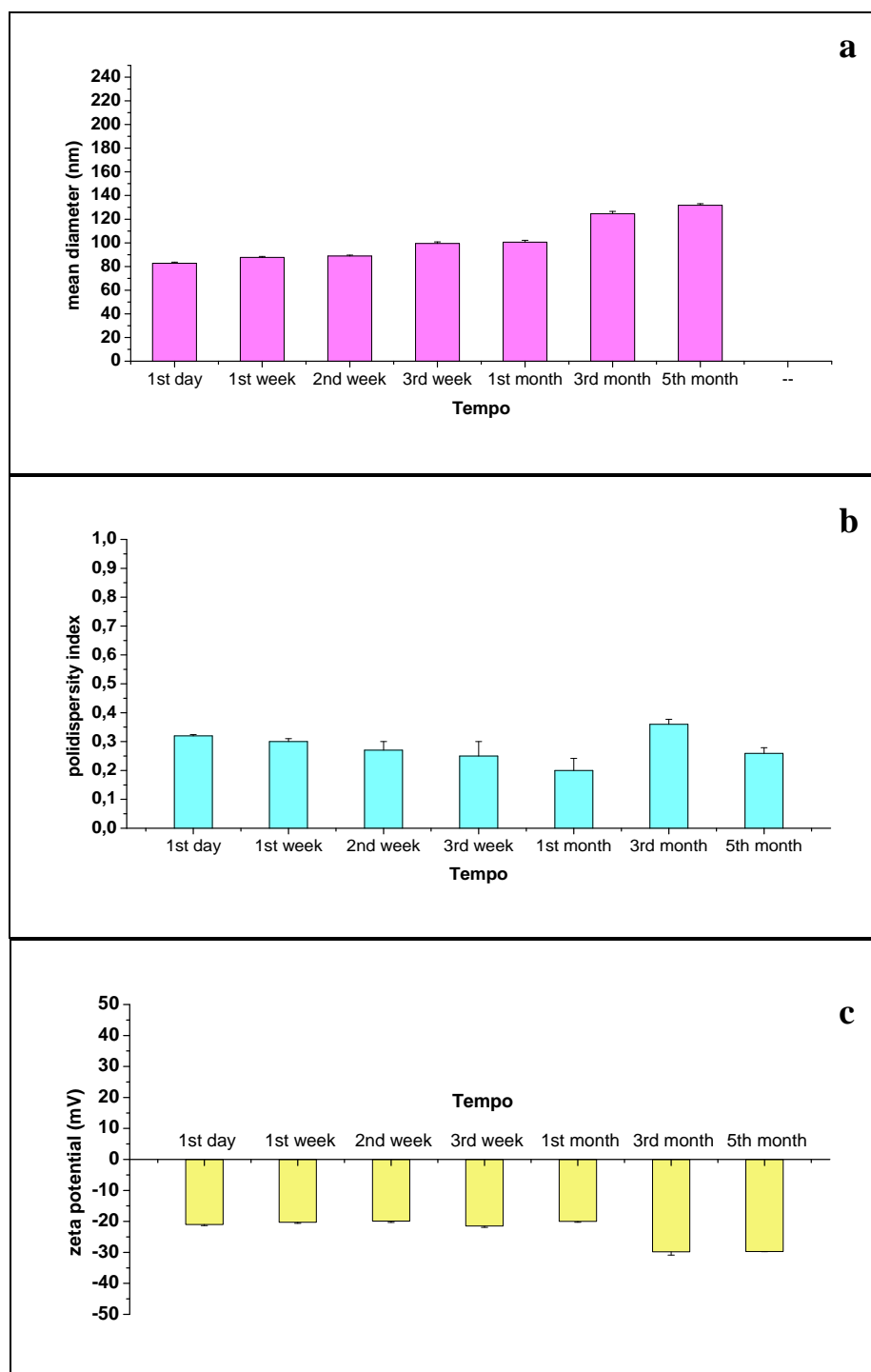
**Tabella 1**

	Conc. lipidica mmol/L	PC:DSPE-PEG % moli	Conc. HB_ngp mmol/L	Conc. HB_Ngp mg/ml
$LP_{cell}$	20	95:5	-	-
$MLP\_Ngp5_{cell}$	20	95:5	4,30	1,00

Il diametro medio idrodinamico dei liposomi privi di magnetite preparati con la miscela PC:DSPE-PEG è risultato differente da quello dei liposomi preparati con il P90.

In particolare, come è possibile osservare dal grafico di Figura 2 a), gli  $LP_{cell}$  presentando un diametro medio di circa 80 nm, sono risultati 30 nm più piccoli rispetto agli LP ottenuti nel capitolo 2, per applicazione dello stesso trattamento di sonicazione. Questa prima differenza osservata. Ciò, pur non sminuendo il lavoro sperimentale riportato nel capitolo precedente, ha messo in luce l'importanza di confermare e approfondire gli esperimenti anche con materiali più puri, seppur più costosi, in quanto parzialmente differenti e responsabili di eventuali variazioni nei risultati finali ottenuti.

Il monitoraggio del diametro medio dei liposomi nel tempo ha permesso di notare un aumento progressivo delle dimensioni delle vescicole, visibile a partire dalla 3<sup>a</sup> settimana. Nel complesso, le formulazioni si sono mostrate abbastanza stabili fino a 5 mesi dalla preparazione, come confermato dal valore dell'indice di polidispersione sempre inferiore a 0,4 (Fig. 2 b). Il potenziale zeta ha mantenuto valori costanti sino al 1° mese, mentre a partire dal 3° mese è aumentato verso valori più negativi, come mostrato in figura 2 c). Complessivamente la carica superficiale dei  $LP_{cell}$  è risultata leggermente inferiori rispetto a quella degli LP preparati nel capitolo 2.

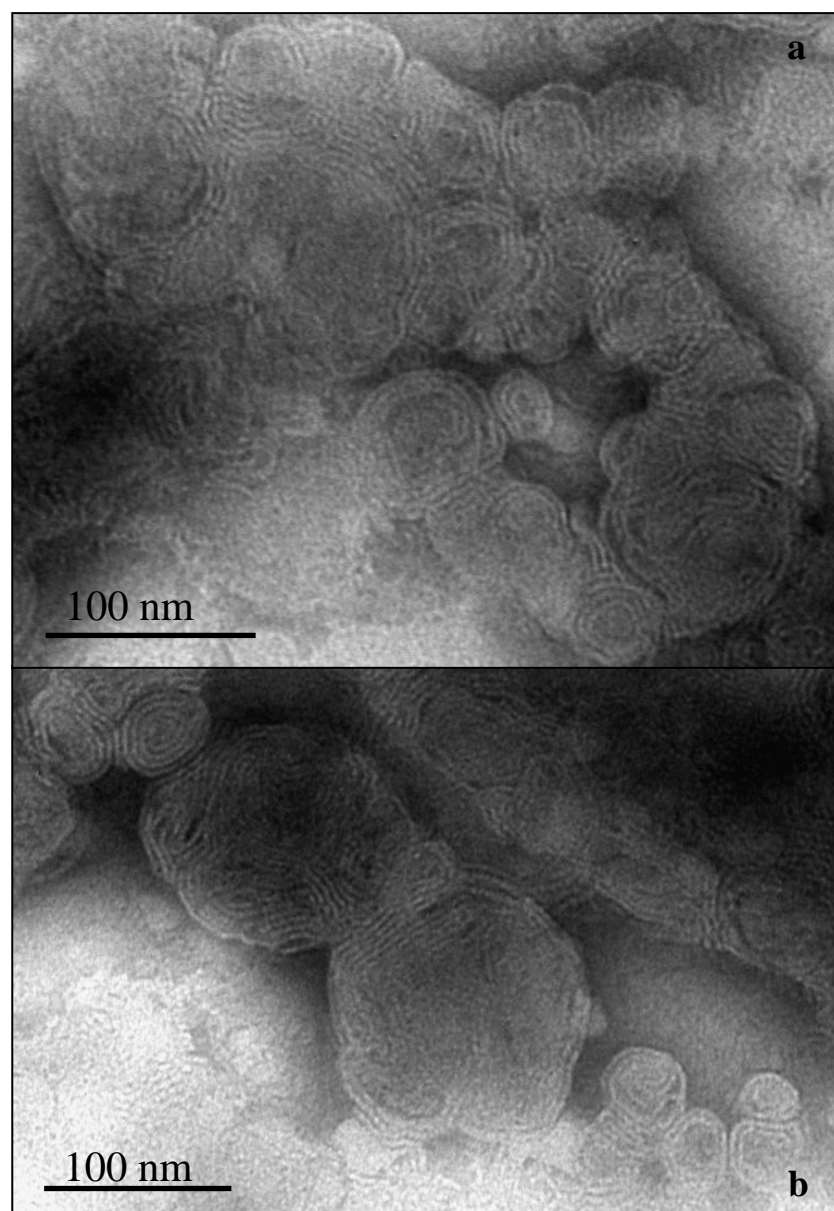


**Fig. 2 a)** Diametro medio dimensionale della formulazione  $LP_{cell}$  in funzione del tempo; **b)** indice di polidispersione della formulazione  $LP_{cell}$  in funzione del tempo; **c)** potenziale zeta della formulazione  $LP_{cell}$  in funzione del tempo.

Anche i liposomi privi di magnetite, prima dell'applicazione alle cellule per i saggi di citotossicità, sono stati sottoposti ad un'attenta analisi TEM, come

---

confermato dalle foto di Fig. 3. I liposomi osservati hanno mostrato una morfologia abbastanza regolare e in accordo con quanto normalmente visualizzato per le strutture vescicolari; nonostante l'applicazione di un intenso trattamento di sonicazione, le immagini TEM hanno mostrato la presenza di membrane oligo/multilamellari.



**Fig. 3 a) e b)** Immagini TEM del campione LP<sub>cell</sub>.

Anche per i magnetoliposomi sono state subito evidenti le differenze tra la formulazione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub>, preparata nella seguente sessione, e le formulazioni di magnetoliposomi preparate, invece, nel programma sperimentale del capitolo 2.

---

---

La semplice analisi visiva per la valutazione della stabilità della dispersione vescicolare, effettuata anche per tutte le formulazioni del capitolo 2 e, in particolare, per gli MLP\_Ngp della **fase 3** (sottoparagrafo 2.3.3.7.1., Fig. 54), ha permesso di mettere in evidenza una stabilità molto più elevata degli MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> rispetto a tutte le formulazioni magnetoliposomiali preparate in precedenza. Infatti non è stata osservata alcuna separazione delle fasi nelle ore e nei primi giorni successivi alla loro preparazione. Solo dopo un periodo di conservazione di 7-10 giorni si è osservata la comparsa di un corpo di fondo volumetricamente molto ridotto e facilmente ridispersibile per semplice agitazione manuale.

Un'altra importante differenza è scaturita dal comportamento degli MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> sottoposti al processo di centrifugazione. Infatti, a differenza di quanto generalmente verificatosi per applicazione della centrifugazione sugli MLP, dai quali si sono venute sempre a separare le 3 classiche fasi, negli MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> la separazione ha dato luogo a sole 2 fasi, un surnatante e un corpo di fondo omogeneamente colorato di marrone. E' risultato totalmente assente il deposito sottostante più scuro, attribuibile ad un sedimento di magnetite. La centrifugazione è stata applicata su 3 distinte preparazioni MLP\_Ngp5<sub>cell</sub>, ottenendo sempre il medesimo risultato.

In conseguenza di quanto appena descritto è risultato impossibile calcolare il valore di associazione % Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-liposomi attraverso la formula riportata a pag. 33. Data l'assenza del corpo di fondo scuro di magnetite, la somma della magnetite presente nel surnatante e nel precipitato marrone rappresenterebbe il totale di magnetite presente nel campione stesso e quindi ad un'associazione % pari al 100%. Tuttavia, la mancata separazione di un corpo di fondo di sola magnetite ha portato ad una riflessione semplice e intuitiva: se per i campioni magnetoliposomiali con valori di associazione %  $\geq$  a 90 è risultata comunque sempre visibile la formazione, nella vial impiegate per la centrifugazione, di un minimo corpo di fondo scuro, l'assenza totale di questa fase dovrebbe corrispondere ad un'associazione %  $>$  al 95%.

Queste considerazioni, oltre a evidenziare l'inutilità dell'impiego della centrifugazione come tecnica di purificazione ai fini del calcolo

---

---

dell'associazione %, hanno fatto sorgere qualche interrogativo su quale campione (prima o dopo centrifugazione) destinare ai saggi di citotossicità.

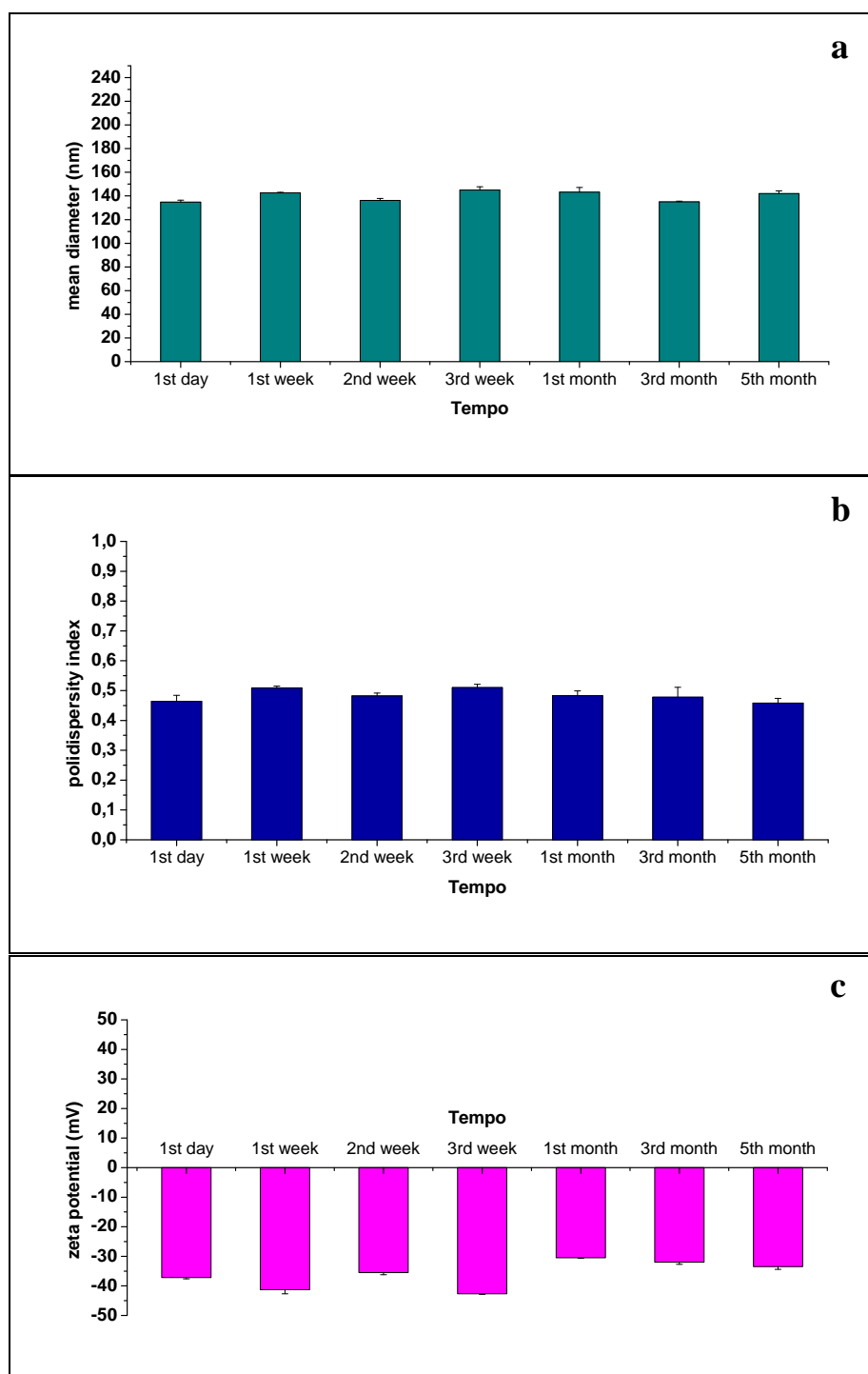
Infatti, se in un primo momento era stato ipotizzato di applicare alle cellule le fasi del surnatante e del precipitato marrone, omogeneamente ridisperse, separate dal precipitato scuro di sola magnetite, dopo l'esito della centrifugazione si è dovuto necessariamente riflettere sull'eventualità di sfruttare, in alternativa, una delle altre metodiche di purificazione precedentemente sperimentate, ovvero la dialisi o la gel cromatografia. Questa idea è stata però presto abbandonata, in considerazione del fatto che i campioni sottoposti a un processo di dialisi o di gel cromatografia, avrebbero potuto subire una destabilizzazione che avrebbe influenzato l'esito degli esperimenti successivi di citotossicità. Nel caso della dialisi il fattore di instabilità è legato alla permanenza del campione in acqua che, protratta per 4 ore come stabilito nelle fasi iniziali della ricerca, portava spesso alla formazione di aggregati nel sacchetto da dialisi. Nel caso invece della gel cromatografia, il fattore destabilizzante potrebbe essere correlato all'alto grado di diluizione subito dal campione, che, oltre a modificare il mezzo disperdente delle vescicole, avrebbe notevolmente complicato i calcoli per la concentrazione e le condizioni per l'applicazione del campione alle cellule.

In conclusione, soffermandoci sul fatto che, dato il valore di associazione % stimato > 90%, la necessità di separare le nanoparticelle libere da quelle presenti nei magnetoliposomi, in realtà, non sussistesse più e che, quindi, le nanoparticelle libere, corrispondendo ad una % inferiore al 10% e subendo una notevole diluizione per aggiunta al mezzo di coltura, non avrebbero comunque potuto modificare significativamente i risultati ottenuti dal saggio di citotossicità, il campione prescelto è stato quello non purificato.

I risultati ottenuti dall'analisi del diametro medio idrodinamico, dell'indice di polidispersione e del potenziale zeta hanno messo in evidenza un'eccellente stabilità nel tempo della formulazione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub>, nonostante l'elevato contenuto in magnetite (Fig. 4 a, b e c), andando a confermare quanto precedentemente valutato per semplice analisi visiva. Tale risultato ha rappresentato un sicuro passo avanti rispetto alle formulazioni preparate nel

---

capitolo 2, che solo raramente sono risultate stabili sino al 5° mese di conservazione.



**Fig. 4** a) Diametro medio dimensionale della formulazione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> in funzione del tempo; b) indice di polidispersione della formulazione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> in funzione del tempo; c) potenziale zeta della formulazione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> in funzione del tempo.



---

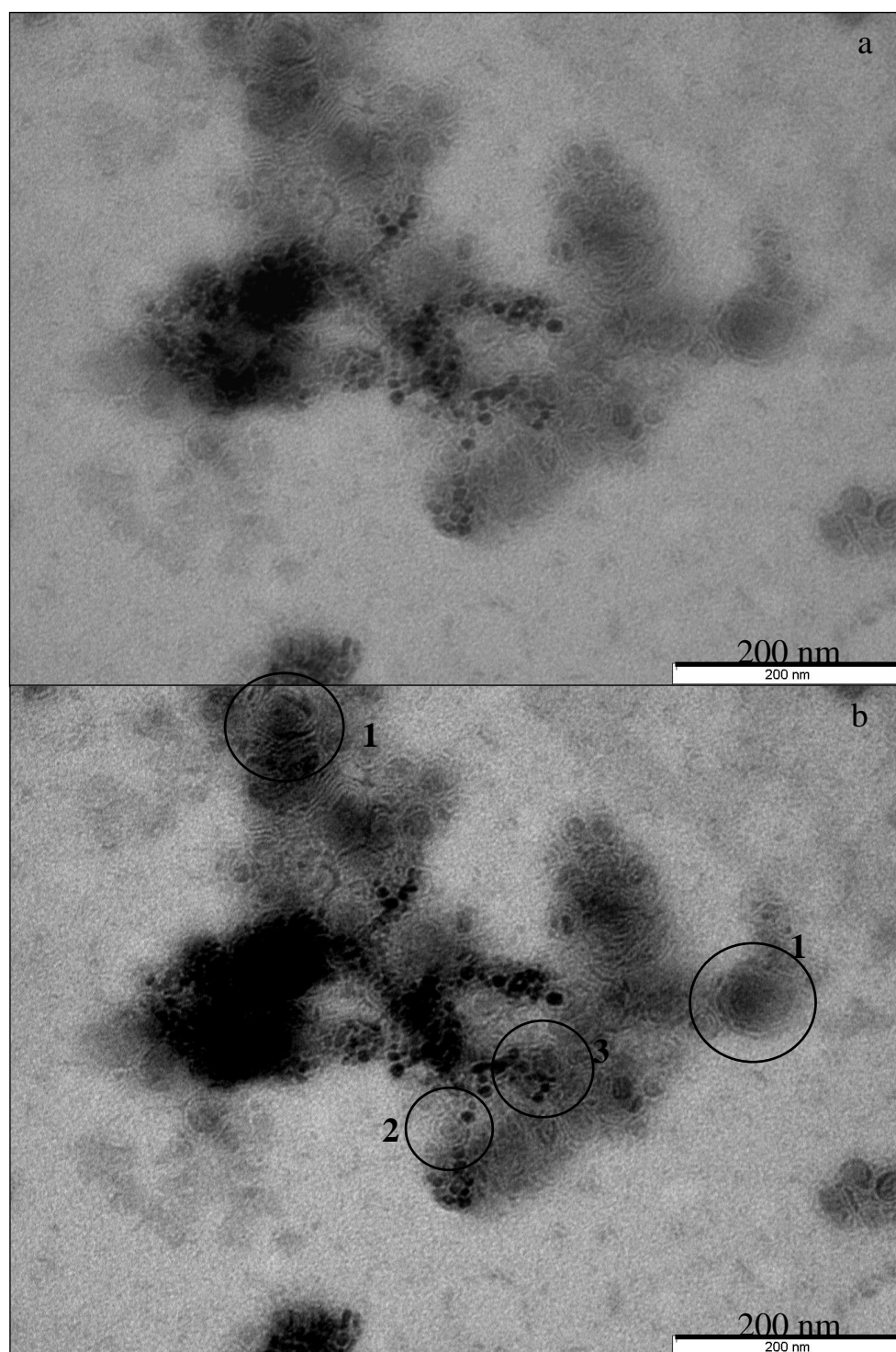
Come è possibile osservare dal grafico di Figura 4 a), le dimensioni degli MLP\_Ngp5<sub>cell</sub>, intorno ai 130 nm, hanno confermato quanto ottenuto nella **fase 3** per gli MLP\_Ngp. I valori ottenuti invece per l'indice di polidispersione e il potenziale zeta sono risultati leggermente differenti da quelli delle formulazioni di riferimento: i valori di IP di poco superiori (Fig. 4b), mentre i valori di potenziale (Fig. 4c) sono aumentati dai circa -25mV degli MLP\_Ngp5 della **fase 3**, ai -35 mV della seguente sessione.

I campioni MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> sono stati sottoposti ad un'attenta analisi TEM. Le immagini TEM degli MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> hanno permesso di visualizzare la presenza di un numero piuttosto elevato di nanoparticelle, per l'elevata concentrazione della magnetite nella formulazione. A tal proposito è importante ricordare che, durante le fasi di studio del capitolo 2, i campioni di MLP\_Ngp5, contenenti una concentrazione in magnetite pari a 1 mg/ml e quindi simile a quella degli MLP\_Ngp5<sub>cell</sub>, non sono stati visualizzati al TEM. La presenza di un numero elevato di nanoparticelle e i differenti fosfolipidi utilizzati, potrebbe essere responsabili della formazione di strutture nuove, non rilevate nei campioni MLP\_Ngp studiati in precedenza. Nelle foto di Fig. 5 e 6, probabilmente a causa della difficoltà di messa a fuoco dei due differenti oggetti presenti nel quadro visivo, lamelle e nanoparticelle, risulta abbastanza difficile apprezzare la presenza di strutture vescicolari. Tale visualizzazione non ha quindi reso facile la valutazione del posizionamento preciso delle HB\_Ngp rispetto alle strutture vescicolari, non lasciando tuttavia alcun dubbio sulla già dichiarata interazione fosfolipidi-HB\_Ngp. Infatti, la presenza di lamelle in corrispondenza delle nanoparticelle, o di aggregati di queste, risulta essere abbastanza chiara, mentre, non risulta sempre ben definita la struttura vescicolare completa, perché assente o perché non messa sufficientemente a fuoco.

Per comprendere meglio le reali strutture presenti nel campione si è cercato di aumentare il contrasto della foto di figura 5 a), rendendo le lamelle presenti maggiormente visibili (Fig. 5 b). Con questo accorgimento sono risultate meglio definite alcune strutture vescicolari, prima non apprezzabili, tra cui alcune vescicole completamente vuote, indicate con **1**, una struttura in cui è facilmente individuabile una nanoparticella inserita nel bilayer fosfolipidico, indicata con **2**

---

e, nel cerchio indicato con **3**, un aggregato nanoparticellare sul quale sembrerebbero direttamente addossate delle lamelle fosfolipidiche.

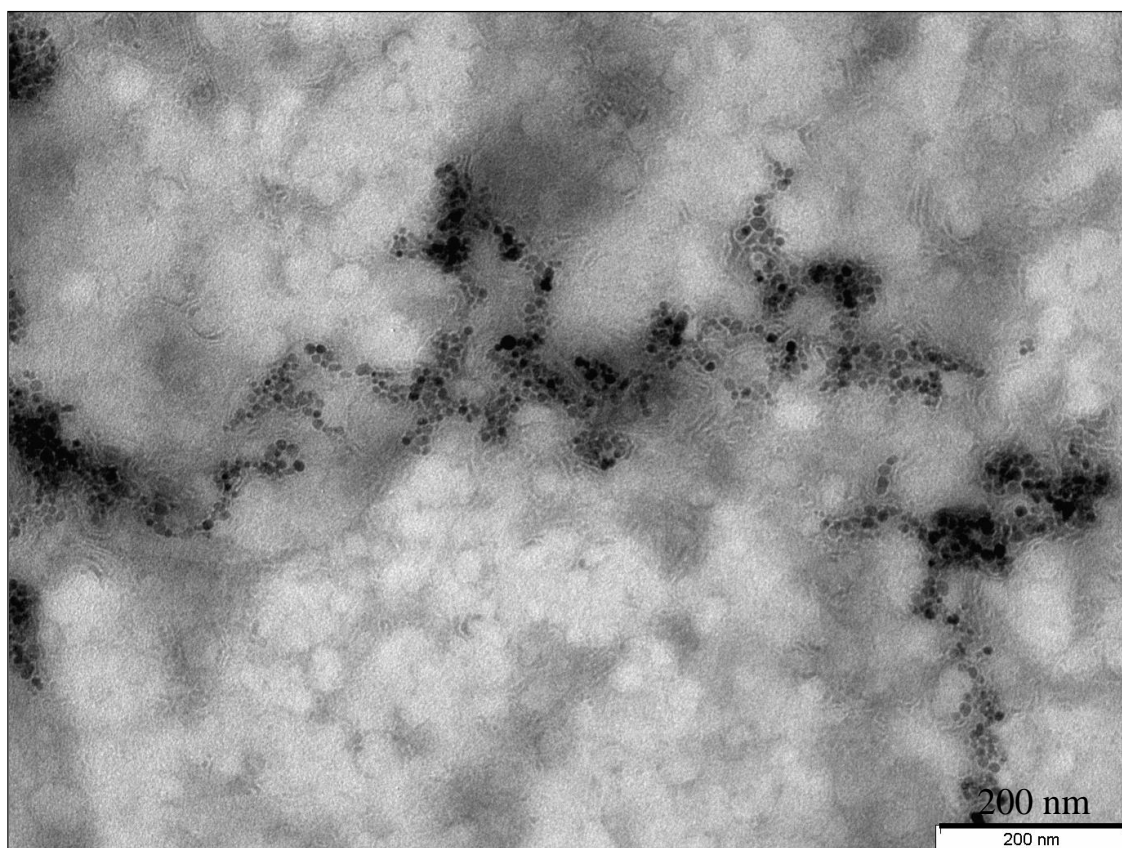


**Fig. 5 a)** Immagine TEM di un campione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub>; **b)** medesima immagine TEM riportata in Fig. 4 a) a contrasto superiore.

---

Nella foto di Figura 6 è possibile osservare la presenza di numerose piccole strutture vescicolari vuote, seppure sempre delineate da un contrasto quasi inapprezzabile. Facilmente identificabili risultano, invece, le nanoparticelle HB\_Ngp, solitamente accompagnate dalla presenza di lamelle, che, tuttavia, difficilmente descrivono l'intera struttura vescicolare.

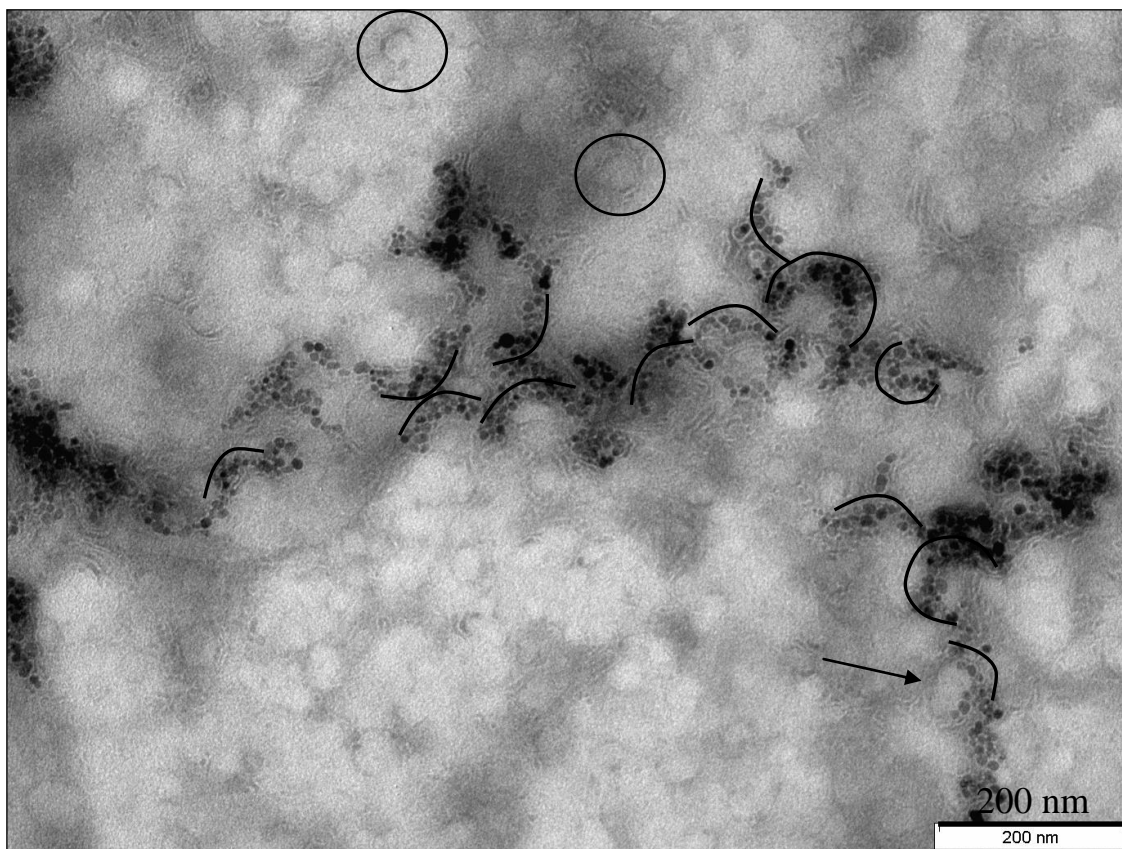
Osservando con particolare attenzione l'immagine, è possibile notare che le nanoparticelle seguono un certo ordine nella loro disposizione, formando una sorta di semicerchi, come messo in evidenza dalle linee inserite nella figura 6 modificata. Questa particolare disposizione sembra dovuta all'inserimento delle nanoparticelle a livello dei bilayers fosfolipidici di piccole strutture vescicolari chiuse, addossate le une alle altre. A conferma di ciò, in una delle strutture presenti nella foto, indicata con la freccia in basso a destra nella fig. 6 mod., si può osservare l'intera struttura vescicolare, sebbene sempre poco marcata, contemporaneamente alle nanoparticelle, inserite nel bilayer.



**Fig. 6** Immagine TEM del campione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> in cui risultano essere ben visibili le nanoparticelle di magnetite mentre poco marcate le lamelle presenti.

---

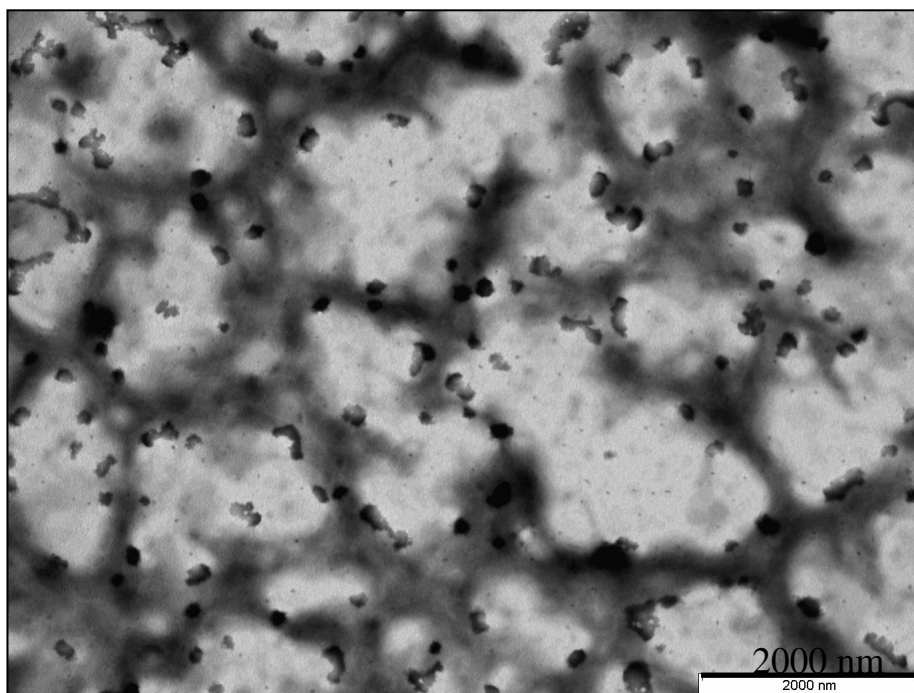




**Fig. 6 mod.** Medesima immagine TEM riportata in figura 5, sottoposta a modificata mediante l'inserimento di linee atte a sottolineare la particolare disposizione delle HB\_Ngp. Strutture messe in evidenza: piccoli sistemi vescicolari vuoti (cerchiati nell'immagine) - gruppi di nanoparticelle disposti a semicerchio (indicati con le linee curve) – un sistema vescicolare completo, contenente nanoparticelle magnetiche (indicato con la freccia).

Il campione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> mostra quindi all'analisi TEM configurazioni paragonabili a quanto già evidenziato nel capitolo 2 negli MLP\_Ngp, ovvero magnetoliposomi con HB\_Ngp inserite nella struttura vescicolare, in corrispondenza dei bilayers fosfolipidici. In particolare, l'immagine di figura 6 ricorda l'immagine della foto di figura 59, riportata nella **fase 2** degli MLP\_Ngp. Proseguendo nell'analisi delle foto TEM è possibile verificare la presenza di altre configurazioni particolari, come mostrato nella figura 7.

Le formazioni scure, di forma irregolare e diametro compreso tra i 100 e i 200 nm, sembrerebbero corrispondere ad aggregati nanoparticellari, come meglio messo in evidenza nelle foto di figura 8, 9 e 10.

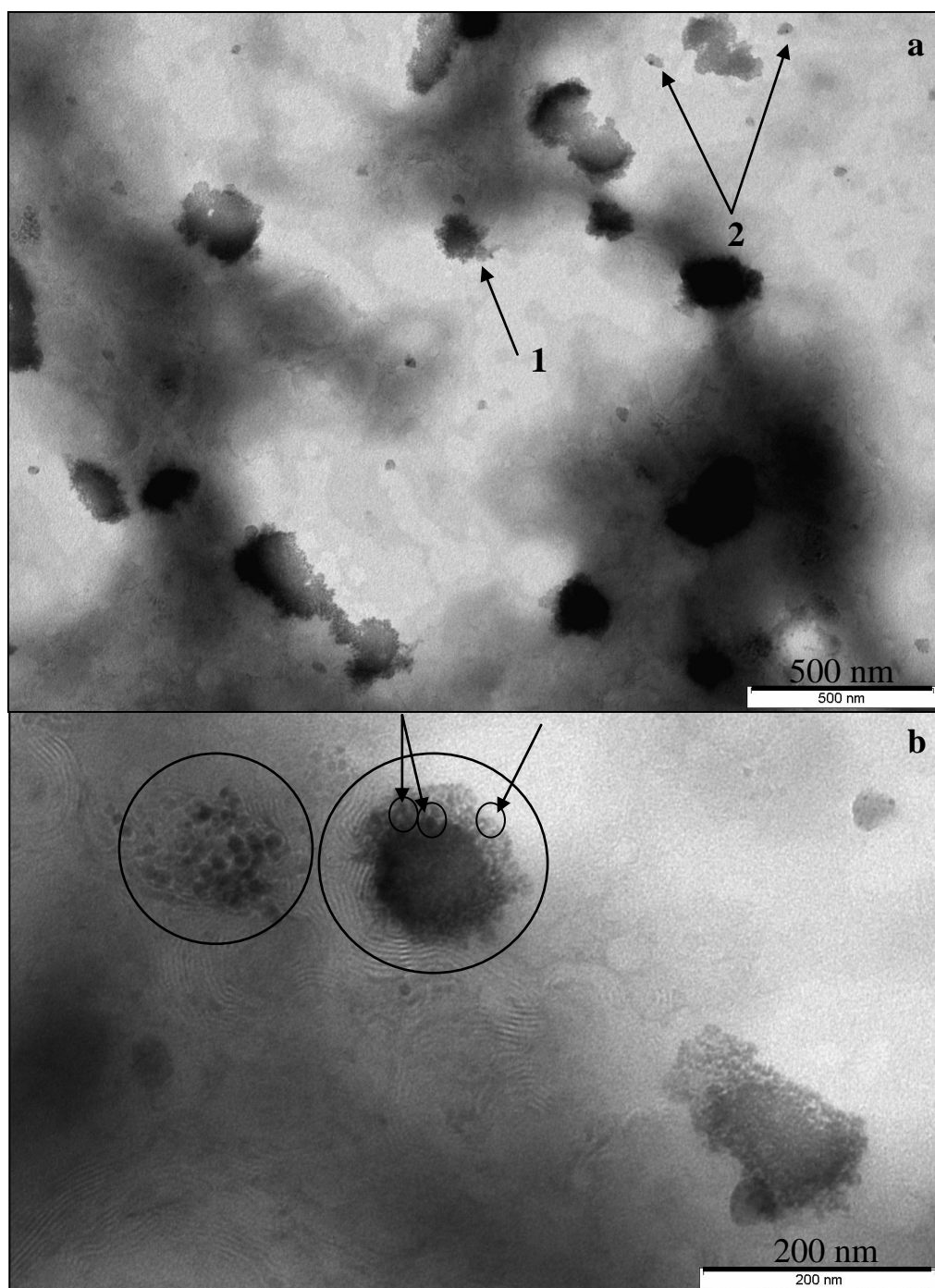


**Fig. 7** Immagine TEM relativa al campione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> caratterizzata dalla presenza di particolari formazioni scure di diametro intorno ai 100-200 nm.

Nella foto di Figura 8 a), oltre a queste formazioni di colore scuro (indicate con **1**), sono state individuate delle strutture di diametro intorno ai 30-50 nm (indicate con **2**) su cui vi è la presenza di 1-2 nanoparticelle di piccole dimensioni; questa seconda struttura è risultata molto simile a quanto già individuato nella foto di fig. 62 relativa alla **fase 2** sugli MLP\_Ngp.

Nella figura 8 b) un aggregato nanoparticellare, chiaramente identificabile, ed una formazione scura, non ben classificabile, vengono a trovarsi in posizione adiacente, permettendo un confronto diretto tra le due configurazioni. Ciò che è possibile evidenziare e che rafforza l'ipotesi di una corrispondenza tra le formazioni scure e gli aggregati nanoparticellari, sono sia la forma posseduta dalle due strutture, particolarmente simile, sia la presenza in alcuni punti della formazione scura di qualche nanoparticella facilmente distinguibile, come indicato dalle frecce. Le formazioni scure sembrerebbero quindi costituite da aggregati nanoparticellari, in cui le nanoparticelle, sovrapposte le une sulle altre, non risultano essere più facilmente distinguibili. Per chiarire meglio la natura di queste strutture, in uno studio futuro potrebbe essere utile svolgere il Darkfield

dello stesso campo visivo che potrebbe confermare la loro entità cristalline di ossidi di ferro.



**Figura 8 a)** Immagine TEM relativa al campione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> su cui sono indicate: **1)** formazioni scure di circa 100-200 nm probabilmente riconducibili a degli aggregati nanoparticellari, **2)** formazioni di circa 30-50 nm, paragonabili a quanto già precedentemente ottenuto in campioni MLP\_Ngp; **b)** immagine TEM del medesimo campione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> in cui sono messi in evidenza un aggregato nanoparticellare circondato da lamelle ed un'adiacente formazione scura, probabilmente anch'essa riconducibile ad un aggregato nanoparticellare, circondata da lamelle.



---

Sia l'aggregato nanoparticellare che la formazione scura della figura 8 b) sono circondati da lamelle che descrivendo una configurazione che va poi a ripetersi anche nelle foto 9 e 10. Tale configurazione richiama fortemente la struttura ricorrente degli MLP\_HB, raffigurata nella foto 37 del capitolo 2, con la differenza che gli aggregati individuati nel campione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> presentano bordi più frastagliati e una forma più irregolare.

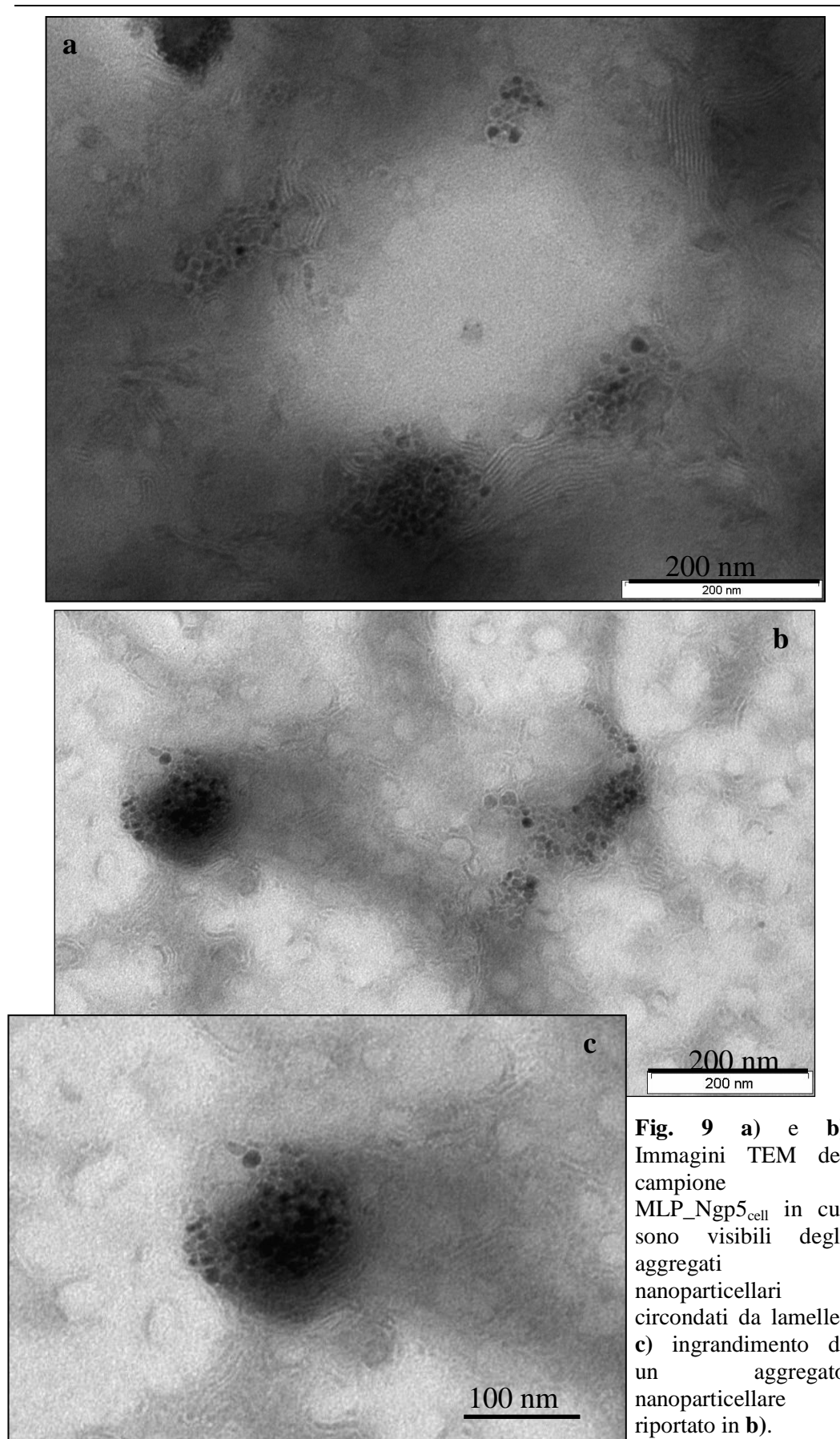
La formazione degli aggregati nanoparticellari potrebbe essere giustificata dall'ipotesi 1, rappresentata schematicamente nella figura 43 di pag. 90, o dall'ipotesi 2, riportata in figura 45 a pag. 91, discusse per gli MLP\_HB.

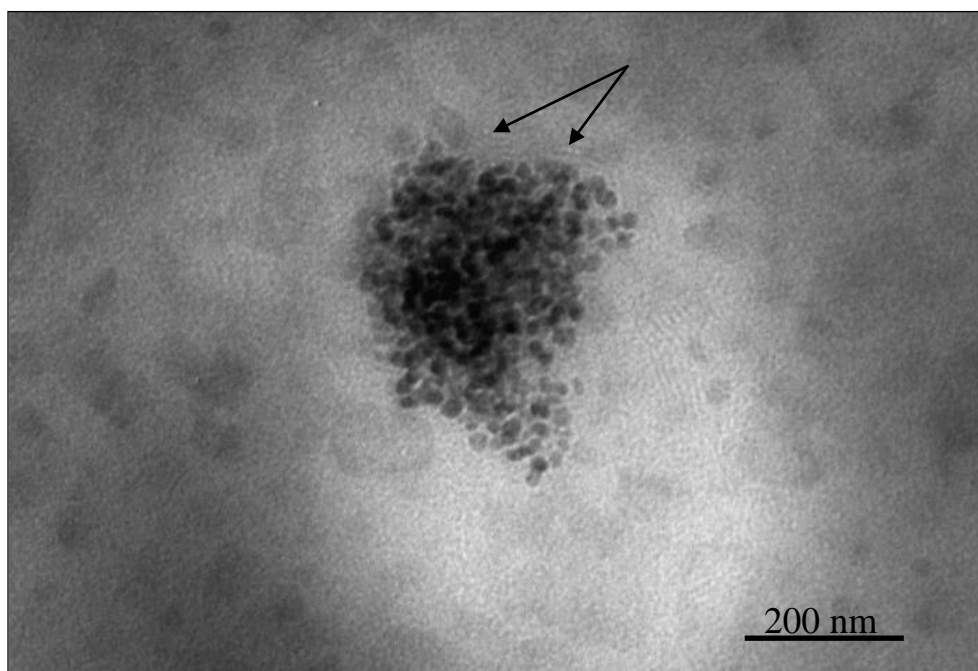
Poiché anche nel caso delle HB\_Ngp, si tratta di nanoparticelle di carattere idrofobico, circondate da acido oleico, poste a contatto con i fosfolipidi abbiamo ritenuto ragionevole fare riferimento, per giustificare le strutture visibili al microscopio, alle stesse ipotesi elaborate per gli MLP\_HB.

Il fatto che tali configurazioni non siano state identificate negli MLP\_Ngp del capitolo 2 (l'unico caso individuato è riferibile alla fig. 52 relativa alla **fase 1** degli MLP\_Ngp) potrebbe dipendere dalla notevole differente concentrazione di magnetite impiegata. Sembrerebbe infatti che la magnetite, fino a determinate concentrazioni, vada a disporsi prevalentemente a livello dei bilayers fosfolipidici delle strutture vescicolari formatesi (vedi foto campioni MLP\_Ngp1\* e 2 del capitolo 2), mentre, a concentrazioni superiori, vada anche a formare delle strutture aggregate.

Negli MLP\_HB tali configurazioni si presentano anche nelle formulazioni a basse concentrazioni in magnetite (pari a 0,2-0,4 mg/ml), indipendentemente dalla concentrazione di magnetite,







**Fig. 10** Immagine TEM del campione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> in cui è visibile un altro esempio di aggregato nanoparticellare circondato da lamelle.

In conclusione, l'analisi TEM ha parzialmente confermato quanto già messo in evidenza per i campioni MLP\_Ngp nel capitolo 2, sull'interazione HB\_Ngp-fosfolipidi e su alcune configurazioni rilevate, ma ha anche messo in luce nuove configurazioni, probabilmente dovute all'alta concentrazione in magnetite applicata e al tipo di fosfolipidi utilizzati. L'assenza di nanoparticelle non associate a lamelle fosfolipidiche, conferma l'assenza di corpo di fondo scuro di magnetite libera osservata dopo centrifugazione..

Inoltre, gli aggregati nanoparticellari rilevati sono apparsi tutti di dimensioni paragonabili, come messo in evidenza dalla panoramica di figura 7, confermando il fatto che le popolazioni di magnetoliposomi e degli aggregati circondati dalle lamelle determinano, nell'insieme, una popolazione dimensionalmente abbastanza omogenea, nonostante la loro diversità strutturale.

Il contenuto in magnetite valutato sulle MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> mediante il saggio della o-fenantrolina, è risultato essere pari a  $0,93 \pm 0,07$  mg/ml (valore medio dei risultati di 3 formulazioni distinte). Questo dato può essere considerato altamente positivo, in quanto sottolinea una perdita in magnetite, durante le fasi di preparazione della dispersione liposomiale, molto limitata.

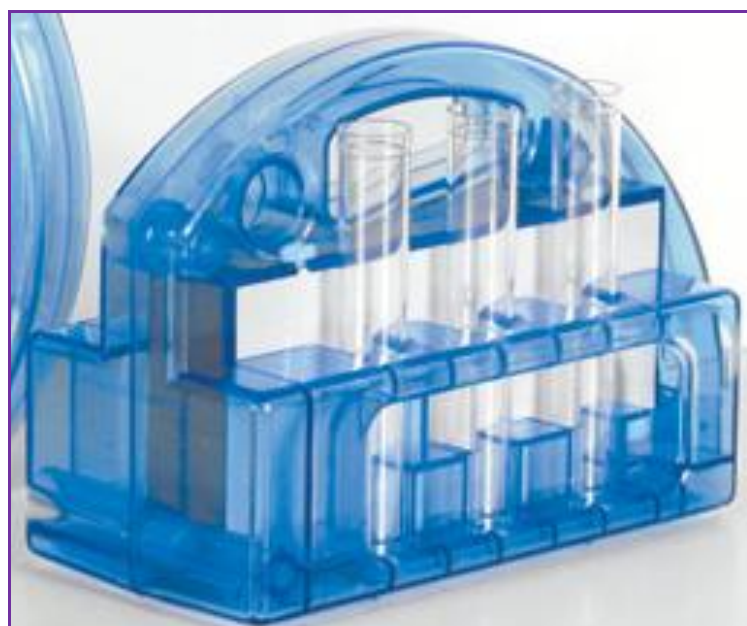
---

---

### 3.3.2. Separazione dei magnetoliposomi e della magnetite mediante l'utilizzo del magnete *BD™ Imagnet*

Il *BD™ Imagnet* riportato in figura 11 ha permesso di mettere in evidenza l'effettiva risposta dei magnetoliposomi al campo magnetico creato dal magnete permanente. In particolare, partendo da una dispersione abbastanza diluita di MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> (1:100 in acqua: 0,2 mM in lipidi, 0,01 mg/ml in magnetite) è stato possibile osservare la formazione graduale di una sottile striscia marrone adesa al magnete.

Questa metodica di analisi, benchè non possa essere considerata esaustiva riguardo le proprietà magnetiche possedute dai magnetoliposomi, ha permesso di confermare l'effettivo potere di magnetizzazione posseduto dagli MLP\_Ngp, grazie alle HB\_Ngp veicolate.



**Fig. 11** Rappresentazione del magnete *BD™ Imagnet* utilizzato per la valutazione della separazione dei magnetoliposomi e della magnetite libera dai liposomi vuoti.

La separazione è avvenuta in tempi brevissimi, infatti, la striscia marrone, riconducibile alla separazione della magnetite libera e dei magnetoliposomi, è risultata chiaramente visibile dopo soli 2-3 minuti dall'inizio dell'esperimento.

---

Ciò nonostante, si è preferito standardizzare la procedura ponendo le dispersioni a contatto con il magnete per un tempo di 10 minuti. Sia i surnatanti separati che le parti adese al magnete ridisperse in acqua sono state sottoposte all'analisi dimensionale misurando il diametro medio idrodinamico e l'indice di polidispersione. Inoltre, come è possibile desumere dalla procedura riportata al paragrafo 3.2.3.3., uno dei due campioni trattati è stato di seguito sottoposto ad un secondo ciclo di separazione, ponendo la parte del surnatante, separata in seguito ai primi 10 minuti di trattamento, nuovamente a contatto con il magnete per altri 10 minuti.

Nel secondo ciclo di separazione non è stato possibile evidenziare visivamente la formazione di un deposito sul magnete, come invece accaduto nel primo ciclo. Tale osservazione è poi stata confermata dalle indagini DLLS, riportate in tabella 2, dove, infatti, risulta chiara l'assenza di magnetoliposomi nel campione. A conferma di quanto appena detto, il diametro medio idrodinamico misurato sul surnatante in seguito al secondo ciclo di separazione, è risultato identico a quello misurato dopo il primo ciclo.

La separazione è risultata quindi efficace e completa attraverso un solo ciclo di separazione.

**Tabella 2**

	diámetro (nm)	IP
MLP_Ngp5 <sub>cell</sub> 1:100 in acqua	144,8±7,0	0,62±0,10
<b>Vial 1</b> parte surnatante - 1° ciclo separazione	91,7±2,1	0,33±0,01
<b>Vial 1</b> parte adesa su magnete ridispersa in acqua - 1° ciclo separazione	379,2±9,8	0,24±0,01
<b>Vial 2</b> parte surnatante - 2° ciclo separazione	92,5±0,4	0,32±0,01
<b>Vial 2</b> parte adesa su magnete ridispersa in acqua - 2° ciclo separazione	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

---

### 3.3.3. Valutazioni preliminari agli esperimenti di citotossicità

Prima di procedere con l'esecuzione dei saggi di citotossicità è stato ritenuto opportuno eseguire una serie di analisi sul diametro medio idrodinamico, sull'indice di polidispersione e sul potenziale zeta posseduti rispettivamente dal terreno di coltura completo, da ciascuno dei suoi componenti, da un campione di prova di MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> e dalle varie miscele ottenute per combinazione di questo con i vari componenti il terreno di coltura, nonché con il terreno completo. Tale indagine preliminare è stata svolta al fine di mettere in evidenza eventuali particolari interazioni tra il mezzo di coltura, o alcuni dei suoi componenti, e la dispersione magnetoliposomiale. L'indagine, inoltre, dovendo ricreare le condizioni reali del saggio di citotossicità, è stata condotta a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>.

L'analisi sui componenti del saggio, così come quella del terreno completo, sono state eseguite senza operare nessuna diluizione preventiva, in quanto i campioni si presentavano sufficientemente limpidi; per l'analisi delle miscele di magnetoliposomi con il terreno completo, o con i relativi componenti, è stata eseguita invece una diluizione della dispersione di magnetoliposomi pari a quella applicata nei primi esperimenti di citotossicità sulle cellule, ovvero di 1:100.

Ad eccezione del tampone fosfato, per il quale non è stato possibile valutare il diametro medio idrodinamico e quindi il relativo indice di polidispersione, per tutti gli altri componenti non è stato rilevato alcun problema nella verifica allo strumento dei 3 parametri suddetti.

In linea generale tutti i vari componenti e le varie miscele hanno mostrato un indice di polidispersione compreso tra 0,4 e 0,6, ad eccezione della miscela derivante da magnetoliposomi e siero e da magnetoliposomi e siero diluito al 10% con tampone, i quali hanno mostrato dei valori molto più elevati.



**Tabella 3**

Campione	Media (nm)	ip	Pot (Mv)
<sup>1</sup> RPMI	28,4 ± 3,1	0,59 ± 0,11	-7,63 ± 2,23
RPMI + <sup>2</sup> L-GLU	25,5 ± 1,6	0,48 ± 0,06	-11,10 ± 1,12
RPMI + FCS*(TERRENO COMPLETO)	20,2 ± 1,6	0,44 ± 0,02	-9,61 ± 0,24
<sup>3</sup> FCS	21,9 ± 0,2	0,50 ± 0,01	-9,54 ± 0,75
FCS*	32,5 ± 1,8	0,55 ± 0,13	-11,90 ± 0,41
TAMPONE FOSFATO	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	-12,50 ± 1,71
TAMPONE + RPMI FCS*	42,1 ± 0,8	0,53 ± 0,09	-10,00 ± 0,93
MAGNETOLIPOSOMI + FCS	56,3 ± 2,4	0,97 ± 0,04	-9,09 ± 0,36
MAGNETOLIPOSOMI + FCS*	115,1 ± 9,6	0,91 ± 0,07	-8,28 ± 0,63
MAGNETOLIPOSOMI + RPMI	139,9 ± 3,6	0,49 ± 0,02	-6,49 ± 0,33
MAGNETOLIPOSOMI + RPMI-L-GLU	133,8 ± 5,3	0,51 ± 0,01	-6,61 ± 0,14
MAGNETOLIPOSOMI + RPMI-FCS*	104,1 ± 7,4	0,59 ± 0,15	-7,41 ± 0,53
MAGNETOLIPOSOMI + TAMPONE FOSFATO	183,9 ± 10,6	0,61 ± 0,12	-7,75 ± 1,11
MAGNETOLIPOSOMI + ACQUA	130,8 ± 1,4	0,46 ± 0,02	-37,30 ± 1,60

FCS\*: FCS diluito al 10% con tampone fosfato.

<sup>1</sup> RPMI: soluzione tamponata contenente piruvato, rosso fenolo (indicatore di pH) ed altre sostanze; l'RPMI corrisponde circa all'88% della composizione del terreno di coltura completo

<sup>2</sup> L-GLU: L-Glutamina; la quale corrisponde circa all'1% della composizione del terreno di coltura completo

<sup>3</sup> FCS: siero fetale di vitello; la soluzione di siero diluita al 10% in tampone (FCS\*) corrisponde circa al 10% della composizione del terreno di coltura completo

Il restante 1% del terreno è rappresentato dalla streptomicina e dalla penicillina aggiunte.

Come è possibile osservare dalla tabella 3, i magnetoliposomi passano da un diametro medio idrodinamico di 130,8 nm e un indice di polidispersione pari a 0,46, ottenuti per diluizione 1:100 in acqua, a un diametro di 104,1 e un IP pari a 0,59 per diluizione 1:100 in terreno di coltura completo (RPMI+FCS\*). L'abbassamento del diametro medio idrodinamico del sistema disperso è probabilmente correlato alla presenza nel campione analizzati di un grande quantitativo di terreno di coltura, caratterizzato da una popolazione con un diametro medio idrodinamico di circa 42 nm, miscelato con una minima parte di magnetoliposomi di diametro medio 130 nm.

Le diverse popolazioni particellari miscelate, rappresentate dai magnetoliposomi e dai sistemi dispersi del terreno di coltura, non dovrebbero comunque interagire tra loro, come dimostrato dall'aumento dell'IP da 0,46 a 0,59, che mette in evidenza la presenza nel campione con una distribuzione dimensionale più ampia. Ciò che infatti si voleva escludere era la formazione di un sistema disperso con elevate dimensioni medie, dovuto all'adsorbimento degli elementi dispersi del mezzo di coltura sulla superficie dei magnetoliposomi.

In realtà, pur essendo sicuramente presente una certa interazione tra il terreno di coltura e il sistema vescicolare, il campione ottenuto non manifesta delle variazioni importanti.

Dato che i saggi di citotossicità sono articolati solitamente in intervalli temporali della durata di 24, 48 e 72 h, è stato ritenuto opportuno proseguire il monitoraggio sulla miscela magnetoliposomi-terreno di coltura completo anche a tali intervalli, mantenendo le miscele a 37°C e al 5% di CO<sub>2</sub>.

Le miscele sono state preparate in doppio e poste separatamente per ciascun intervallo di tempo (per un totale di 6 miscele), in modo da non manipolare più volte il campione. I risultati riportati per ciascun intervallo rappresentano la media e la deviazione delle due miscele analizzate.

**Tabella 4**

Tempo (h)	MEDIA	IP	POT.
T0	104,1 ± 7,4	0,59 ± 0,15	-7,41 ± 0,53
T24	109,4 ± 1,5	0,74 ± 0,06	-6,88 ± 0,31
T48	109,1 ± 10,7	0,53 ± 0,02	-7,20 ± 0,04
T72	105,4 ± 2,0	0,54 ± 0,02	-6,93 ± 0,25

Come è possibile osservare dalla tabella 4, la miscela magnetoliposomi-terreno di coltura non sembra andare incontro a particolari fenomeni di aggregazione nell'arco delle 72 h.

Date tali considerazioni si è deciso di proseguire con l'esecuzione dei saggi di citotossicità.

---

### 3.3.4. Il saggio del Trypan Blue

La scelta della formulazione magnetoliposomiale alla concentrazione di 1 mg/ml in magnetite è scaturita dall'analisi degli studi attualmente presenti in letteratura<sup>1,9</sup> e degli esperimenti su ossidi ferro molto simili a quelli da noi utilizzati, condotti nel laboratorio di Scienze e Tecnologie Biomediche, sezione di Patologia Sperimentale, dell'Università di Cagliari.<sup>10</sup>

Gli esperimenti sono stati articolati in due sessioni sperimentali: nella prima sessione le formulazioni sono state applicate alle cellule in un rapporto 1:100, mentre, nella seconda nei rapporti 1:250, 1:500 e 1:1000.

Nella tabella 5 sono riepilogati i vari rapporti di diluizione eseguiti e le corrispondenti concentrazioni in HB\_Ngp e in lipidi ottenuti nel mezzo di coltura, derivanti, rispettivamente, dall'applicazione della dispersione di nanoparticelle e dei magnetoliposomi e dall'applicazione dei liposomi e dei magnetoliposomi.

**Tabella 5**

<b>Diluizione</b>	<b>1:100</b>	<b>1:250</b>	<b>1:500</b>	<b>1:1000</b>
<b>HB_Ngp µg/ml</b>	10,30	3,72	1,86	0,93
<b>[lipidi] mM</b>	0,2	0,08	0,04	0,02

#### 3.3.4.1. Prima sessione sperimentale

Avendo valutato, mediante il saggio della *o*-fenantrolina, il contenuto di partenza in magnetite della formulazione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> preparata, pari precisamente a 1,03 mg/ml, si è proceduto con la preparazione di una dispersione di sole HB\_Ngp ad analoga concentrazione.

Le HB\_Ngp da applicare alle cellule, trovandosi disperse in cloroformio, hanno necessariamente richiesto il preventivo allontanamento del solvente organico, mediante l'uso di un evaporatore rotante, e la seguente ridispersione in un opportuno mezzo idrofilo, capace di permetterne l'applicazione in vitro

La scelta del mezzo idrofilo in cui ridisperdere le HB\_Ngp, data la loro natura apolare, non è potuta ricadere né sull'acqua né sul tampone; sono quindi state fatte delle prove, con buoni risultati, disperdendo le nanoparticelle in etanolo e in DMSO. Il DMSO, in particolare, ha permesso di ottenere una dispersione

---



---

omogenea e relativamente stabile nel tempo. Data la nota tossicità del DMSO nei confronti delle cellule, la dispersione di magnetite è stata preparata utilizzando un volume di DMSO tale che la sua concentrazione finale nel mezzo di coltura (0,2%) cadesse al di sotto del minimo valore tossico, pari all'1%.

Nel grafico di figura 12 sono stati riportati i risultati della conta cellulare eseguita alle 24 h. Come è possibile osservare dalle barre dell'istogramma, il numero delle cellule viventi/mL in presenza di liposomi e di magnetoliposomi è risultato essere drasticamente ridotto rispetto al controllo. In particolare in termini di vitalità cellulare (%), è risultato pari circa al 60% di vitalità, nel caso dell'applicazione dei liposomi privi di magnetite, mentre, pari a circa il 40% per i magnetoliposomi (24 h - Fig.13).

I risultati ottenuti con i liposomi vuoti sono andati in netto contrasto con quanto riportato in letteratura<sup>1</sup>, riguardo esperimenti di citotossicità sulla linea cellulare macrofagica J774. In questo studio viene riportata una riduzione della vitalità cellulare pari al 25% esclusivamente nel caso dell'applicazione di concentrazioni lipidiche superiori a 2 mM (riferite nello specifico a sistemi vescicolari peghilati con DSPE-PEG<sub>2000</sub>), contro i 0,2 mM da noi applicati. Per concentrazioni inferiori a 2 mM. Non viene riportata alcuna citossicità significativa

Tuttavia, vi è da sottolineare che nel lavoro di Martina et al.<sup>1</sup>, oltre alla differente linea cellulare utilizzata, è stato usato il test MTT, da noi qui non discusso, ma sul quale è stato avviato un ulteriore studio di approfondimento, relativo, appunto, al possibile falso positivo, correlabile al carattere apolare del 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) ed alla sua elevata affinità per i substrati lipofili citoplasmatici<sup>3</sup> e, quindi, all'eventuale interferenza dei liposomi, di natura lipidica.

Per i magnetoliposomi, la ridotta vitalità cellulare riscontrata può essere giustificata dal duplice effetto svolto sia dai sistemi vescicolari, di per sé già citotossici nelle concentrazioni impiegate, che dalla magnetite in essi contenuta, la quale, associata in percentuali elevate, va sicuramente incontro ad un massiccio fenomeno di internalizzazione cellulare.

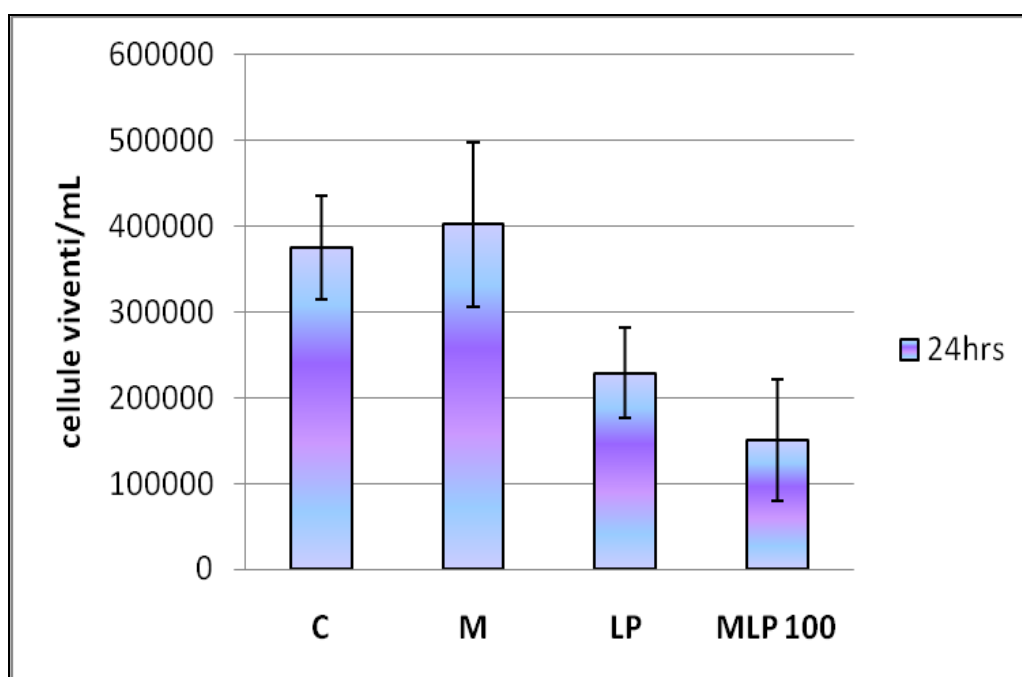
Considerata l'elevata concentrazione di magnetite applicata con i magnetoliposomi, la differenza di vitalità, a 24 h dall'applicazione, tra i liposomi

---

vuoti (60% di vitalità) ed i magnetoliposomi (40% di vitalità), non prova di per sé un'elevata citotossicità da parte della magnetite, mentre conferma quella relativa ai sistemi vescicolari.

L'assoluta assenza di tossicità rilevata, invece, per la magnetite libera può essere riconducibile al fatto che le HB\_Ngp, pur essendo disperse omogeneamente nel mezzo idrofilo, data la loro natura idrofobica, danno luogo, dopo qualche tempo, ad un leggero fenomeno di aggregazione e sedimentazione, il quale comporta un contatto magnetite/cellule limitato, sia numericamente che temporalmente.

La magnetite libera, non possedendo di per sé caratteristiche ottimali per interagire con la cellula ed essere internalizzata, non può comportare particolari effetti citotossici.

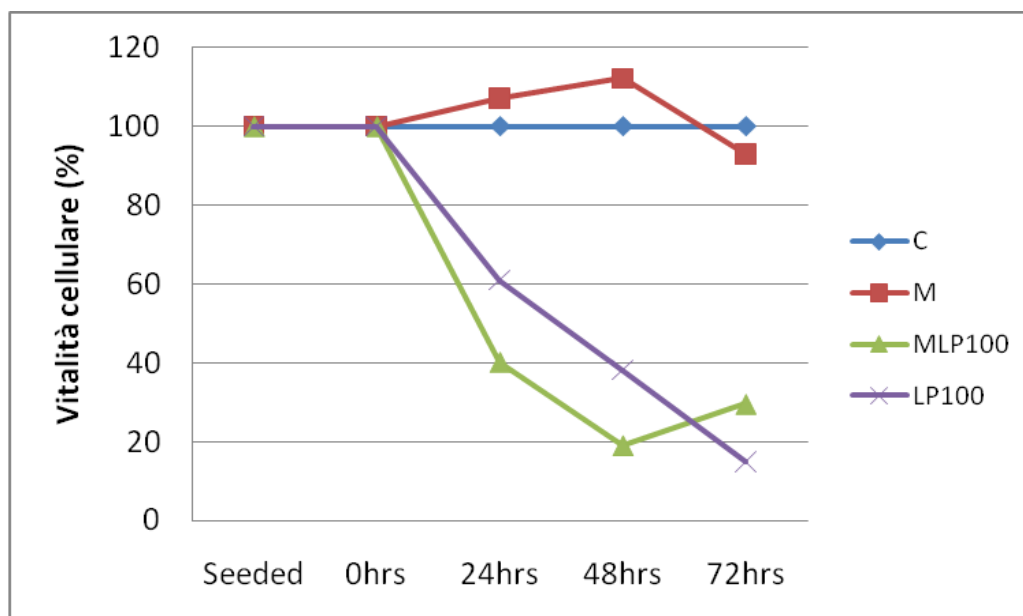


**Fig. 12** Grafico relativo alle cellule viventi/ml valutate mediante il saggio del Trypan Blue all'intervallo temporale delle 24 h. C: controllo - M: HB\_Ngp applicate alla concentrazione di 10,30  $\mu\text{g/ml}$  - LP: Lp<sub>cell</sub> applicati in rapporto 1:100, raggiungendo la concentrazione lipidica finale di 0,2 mM - MLP 100: MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> applicati in rapporto 1:100, raggiungendo una concentrazione finale in magnetite pari a 10,30  $\mu\text{g/ml}$  e una concentrazione lipidica finale di 0,2 mM.

Nonostante l'andamento del saggio di citotossicità fosse già abbastanza chiaro dall'analisi eseguita alle 24 h, si è deciso di proseguire il saggio sino alla 72<sup>a</sup> h.

I dati di vitalità misurati dopo questo periodo di applicazione hanno confermato l'elevata tossicità indotta dai liposomi e dai magnetoliposomi e la quasi totale

innocuità della magnetite, responsabile di una riduzione della vitalità cellulare del 7% (fig. 13).



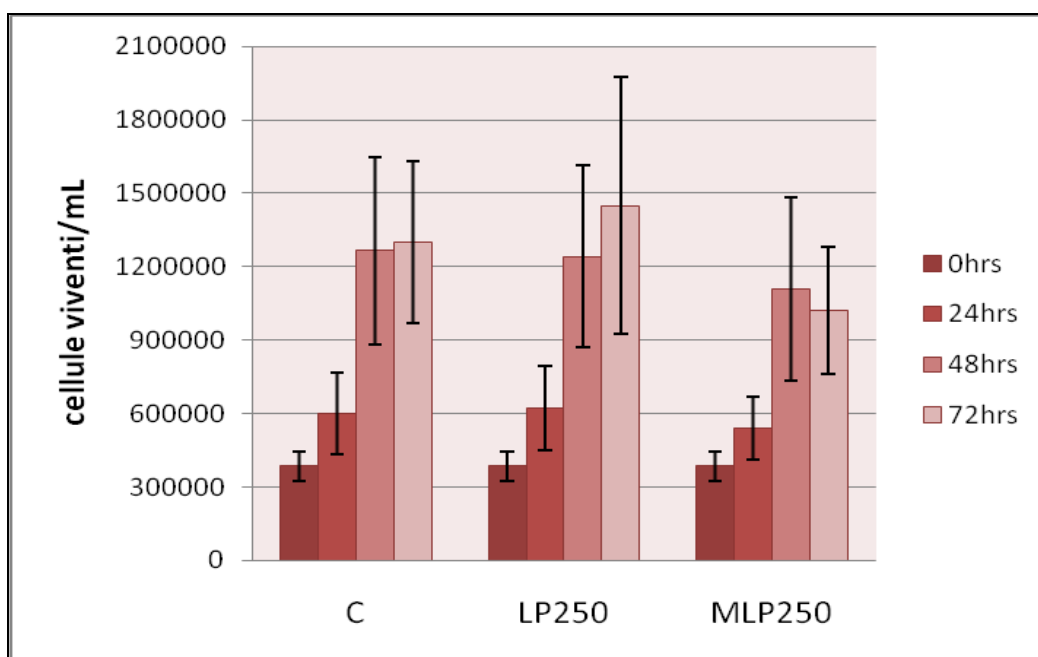
**Fig. 13** Vitalità cellulare valutata alle 24, 48 e 72 h per applicazione alle cellule della magnetite (M), della MLP\_Ngp5cell (MLP100) e dei liposomi vuoti (LP100) nel rapporto di 1:100.

Tale valutazione preliminare ha permesso di fare alcune riflessioni: a) la concentrazione lipidica finale ottenuta per applicazione delle formulazioni in rapporto 1:100 era troppo elevata e quindi, nella sessione sperimentale successiva, si sarebbe proceduto mediante l'applicazione delle formulazioni nei rapporti 1:250, 1:500 e 1:1000; b) non era necessario svolgere ulteriori studi di citotossicità con le HB\_Ngp, data la loro completa biocompatibilità riscontrata in questa prima sessione sperimentale.

#### 3.3.4.2. Seconda sessione sperimentale

La seconda sessione sperimentale è stata svolta a partire da una formulazione MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> con concentrazione in magnetite pari a 0,93 mg/ml. L'applicazione delle formulazioni al mezzo di coltura è stata svolta nei rapporti 1:250, 1:500 e 1:1000, raggiungendo le concentrazioni finali in magnetite riportate nella tabella 5.

Nel grafico di figura 14 sono stati confrontati i risultati ottenuti per applicazione al mezzo di coltura dei liposomi vuoti e dei magnetoliposomi in rapporto 1:250. Come è possibile osservare dal grafico, l'andamento del controllo e dei liposomi vuoti è risultato paragonabile per l'intera durata dell'esperimento (72h), sottolineando la completa biocompatibilità dei sistemi vescicolari a tali concentrazioni; al contrario, per applicazione dei magnetoliposomi è stata riscontrata una leggera riduzione delle cellule viventi/ml. In particolare, la vitalità delle cellule incubate con i magnetoliposomi in rapporto 1:250 alle 24 h è risultata ridotta di circa il 10% rispetto al controllo (Fig 16), contro il 60% rilevato nella prima sessione sperimentale (Fig.13). Alle 72 h i magnetoliposomi hanno indotto una riduzione della vitalità cellulare, rispetto al controllo, pari al 22%, mostrandosi, nel complesso, debolmente citotossici.



**Fig.14** Grafico relativo alle cellule viventi/ml valutate mediante il saggio del Trypan Blue per applicazione delle formulazioni LP<sub>cell</sub> ad MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> sino alle 72 h. C: controllo - LP250: LP<sub>cell</sub> applicati in rapporto 1:250, raggiungendo la concentrazione lipidica finale di 0,08 mM - MLP250: MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> applicati in rapporto 1:250, raggiungendo una concentrazione finale in magnetite pari a 3,72 µg/ml e una concentrazione lipidica finale di 0,08 mM.

Data la non citotossicità dei liposomi vuoti applicati alle cellule in rapporto 1:250, di seguito si riportano i risultati relativi esclusivamente ai magnetoliposomi applicati nei 3 rapporti 1:250, 1:500 e 1:1000. Come è

---

possibile osservare dal grafico di figura 15, la conta cellulare ha messo in evidenza un differente comportamento alle 48 h tra le applicazioni in rapporto 1:500 e 1:1000 e l'applicazione in rapporto 1:250; quest'ultima ha determinato alle 48 h una riduzione della vitalità, rispetto al controllo, pari al 12%, come visibile nel grafico di figura 16, dovuta alla maggiore concentrazione di magnetite contatto con le cellule o in esse internalizzata.

La conta cellulare effettuata alle 72 h; riportata nel grafico di figura 15, mostra che le tre differenti applicazioni dei magnetoliposomi hanno determinato una vitalità % dell'80% (fig. 16). Il fatto che per tutte le applicazioni si sia verificato alle 72h il medesimo risultato finale, indipendentemente dalle concentrazioni applicate, dimostra che è il contatto tra i magnetoliposomi e le cellule che riduce la vitalità cellulare. La sofferenza cellulare, indotta dal contatto o dal processo di internalizzazione, si manifesta infatti dopo un periodo prolungato dall'applicazione. Poiché liposomi vuoti applicati in rapporto 1:250 mostravano una vitalità cellulare alle 72h addirittura superiore al 100%, la riduzione all'80% riscontrata con i magnetoliposomi può essere imputabile unicamente alla presenza della magnetite, venuta a contatto con le cellule o in esse internalizzata. La magnetite, quindi, quasi totalmente innocua se applicata da sola (vitalità cellulare alle 72h pari al 93%), quando associata alle vescicole fosfolipidiche che favoriscono l'interazione con le cellule, può rappresentare un fattore di stress per queste ultime, riducendone la vitalità.

In conclusione, le formulazioni magnetoliposomiali non hanno mostrato un'influenza significativa sulla vitalità cellulare se applicate nel mezzo di coltura in modo da raggiungere una concentrazione in magnetite  $\leq$  a 3,72  $\mu\text{g/ml}$  e in lipidi  $\leq$  a 0,08 mM, mentre sono risultate particolarmente citotossiche se applicate a concentrazioni in magnetite  $\geq$  a 10,3  $\mu\text{g/ml}$  e in lipidi  $\geq$  a 0,2 mM.

A tal proposito, sarebbe quindi interessante andare a verificare il trend relativo alla vitalità cellulare corrispondente all'applicazione alle cellule degli MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> nei rapporti compresi nel range 1:100-1:250.

Facendo un breve paragone con lo studio di Martina et al.<sup>1</sup> è possibile sottolineare alcune importanti differenze nei risultati ottenuti: la prima riguarda la citotossicità dei liposomi vuoti peghilati applicati alle cellule alla

---

---

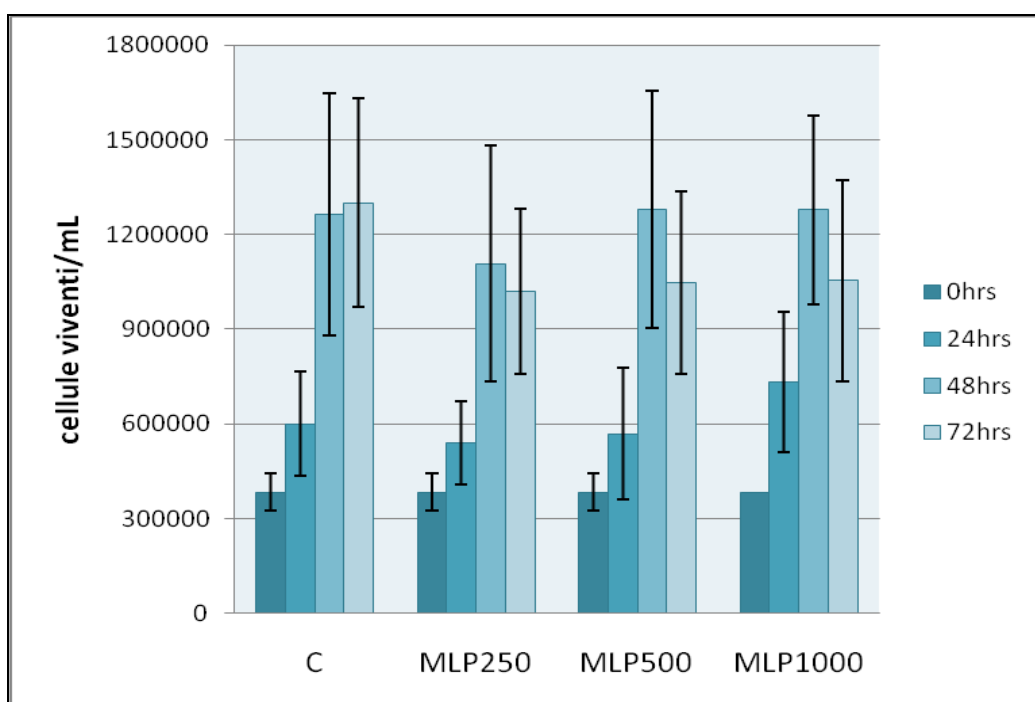
concentrazione lipidica di 0,2 mM, per i quali, nel nostro caso, si sono ottenuti dei valori di citotossicità molto elevati, con una riduzione della vitalità alle 24 h pari al 40%, mentre, nel loro caso non sono stati riscontrati valori significativamente citotossici; al contrario, nel loro lavoro viene messa in evidenza un'elevata citotossicità per i liposomi convenzionali, ovvero non peghilati, a concentrazioni  $\geq$  a 0,2 mM.

La seconda differenza riguarda la citotossicità dei magnetoliposomi, che, nel nostro caso, è risultata molto elevata per concentrazioni di magnetite uguali a 10,30  $\mu\text{g/ml}$  ( $\sim$  0,12 mM in ferro), mentre, nel loro caso, viene definita 'non significativa' per i sistemi magnetoliposomiali peghilati e ridotta del 40% per i sistemi vescicolari convenzionali associati a concentrazioni in ferro  $>$  a 0,2 mM.

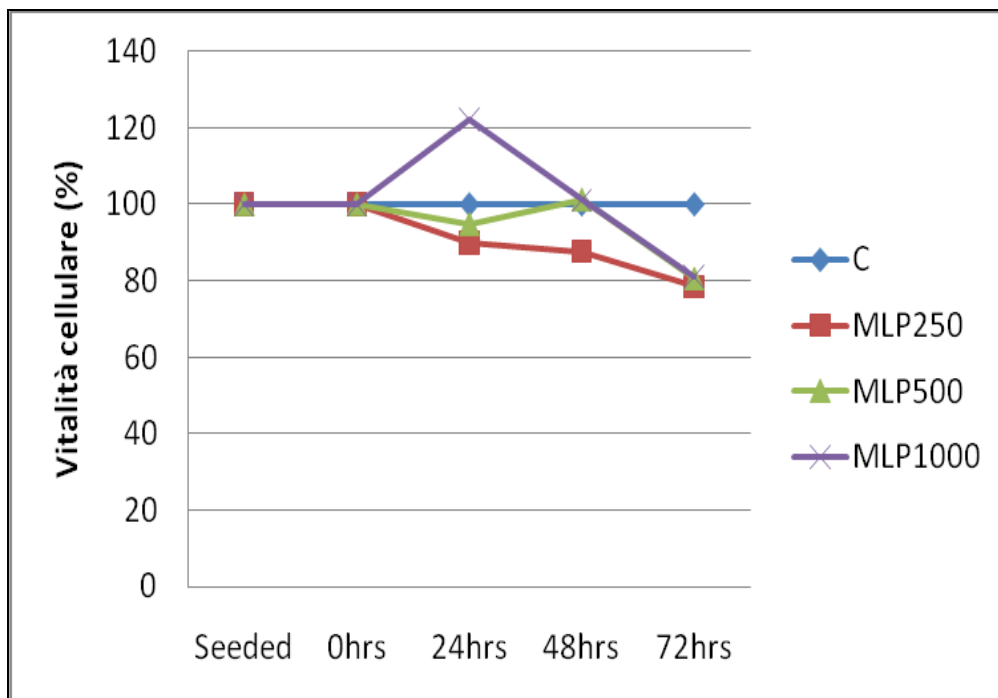
La terza e ultima osservazione riguarda invece la magnetite applicata da sola, la quale nel nostro caso è risultata non significativamente citotossica nell'arco delle 72h, applicata alla concentrazione di 10,30  $\mu\text{g/ml}$  ( $\sim$  0,12 mM in ferro), mentre, nel loro caso, ha determinato una riduzione della vitalità del 50% dopo sole 4 h dall'applicazione alla concentrazione di 0,02 mM in ferro.

Tali differenze, pur suscitando ovviamente numerosi interrogativi, trovano anche svariate possibili giustificazioni, come per esempio la differente linea cellulare utilizzata e il differente tipo di magnetite coinvolta; ciò che invece non differisce nei due lavori è la miscela lipidica e i rapporti molari utilizzati per la preparazione dei sistemi vescicolari peghilati.

Queste valutazioni sottolineano l'importanza dei parametri applicati nell'esecuzione dei saggi di citotossicità al fine di poter paragonare tra loro i risultati ottenuti. Inoltre, vi è da sottolineare nuovamente che nel lavoro di Martina et al.<sup>1</sup> è stato usato il test MTT, da noi qui non discusso, in quanto ritenuto, anche se in via del tutto preliminare, poco attendibile per tali nanocompositi, dando luogo a dei risultati sovrastimati e quindi a dei falsi positivi.



**Fig. 15** Grafico relativo alle cellule viventi/ml valutate mediante il saggio del Trypan Blue per applicazione della formulazione MLP\_Ngp5cell sino alle 72 h. C: controllo – MLP250: MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> applicati in rapporto 1:250, concentrazione finale in magnetite 3,72 µg/ml, in lipidi 0,08 mM - MLP500: MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> applicati in rapporto 1:500, concentrazione finale in magnetite 1,86 µg/ml, in lipidi 0,04 mM – MLP1000: MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> applicati in rapporto 1:1000, concentrazione finale in magnetite 0,93 µg/ml, in lipidi 0,02 mM.



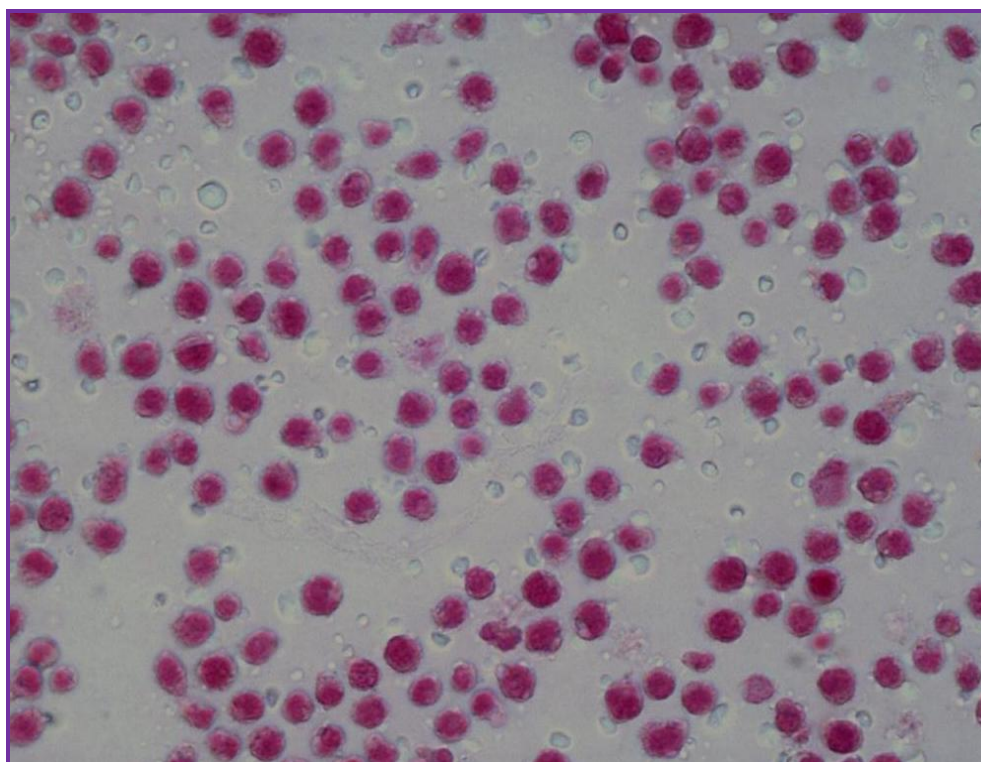
**Fig. 16** Vitalità cellulare valutata alle 24, 48 e 72 h per applicazione alle cellule della MLP\_Ngp5cell nei rapporti di 1:250, 1:500 e 1:1000.



---

### 3.3.5. Visualizzazione del ferro internalizzato mediante il saggio del Blu di Prussia

Nella foto di figura 17 è raffigurato il controllo, ovvero le sole cellule trattate secondo la procedura riportata al paragrafo 3.3.5., non sottoposte all'incubazione con la magnetite o i magnetoliposomi. Come è possibile osservare dalla foto, le cellule appaiono colorate in rosa, mostrando una tonalità più scura in corrispondenza dei nuclei cellulari; le cellule, inoltre, appaiono di forma sferica e aspetto regolare.



**Fig. 17** Visualizzazione al microscopio ottico delle cellule trattate con NFR.

Nella figura 18 a) e b) sono invece riportate le foto relative alle cellule incubate con le HB\_Ngp. Nelle immagini è possibile osservare la presenza di aggregati nanoparticellari, di dimensioni variabili, colorati di blu brillante; il loro posizionamento si è mostrato abbastanza casuale e non ha messo in evidenza particolari interazioni con le cellule presenti nelle vicinanze; anche nel caso in cui il blu degli aggregati nanoparticellari è andato a sovrapporsi alle cellule non sembrerebbe sussistere una reale interazione nanoparticelle-cellule, dato che le

---

---

macchie blu si distinguono chiaramente dalle cellule sottostanti. Tuttavia, si suppone che una interazione nanoparticelle-cellule avvenga dato che, queste ultime, diversamente dal controllo, hanno manifestato una certa sofferenza con la parziale perdita della forma sferica regolare e una blanda colorazione con il Nuclear Fast Red.

L'uptake cellulare della magnetite potrebbe non essere chiaramente visibile in quanto, pur riuscendo ad entrare nella cellula, gli ioni ferrici coinvolti nella formazione del composto colorato non riescono ad essere presenti in una concentrazione tale da determinare una colorazione interna apprezzabile al microscopio ottico ed agli ingrandimenti usati.

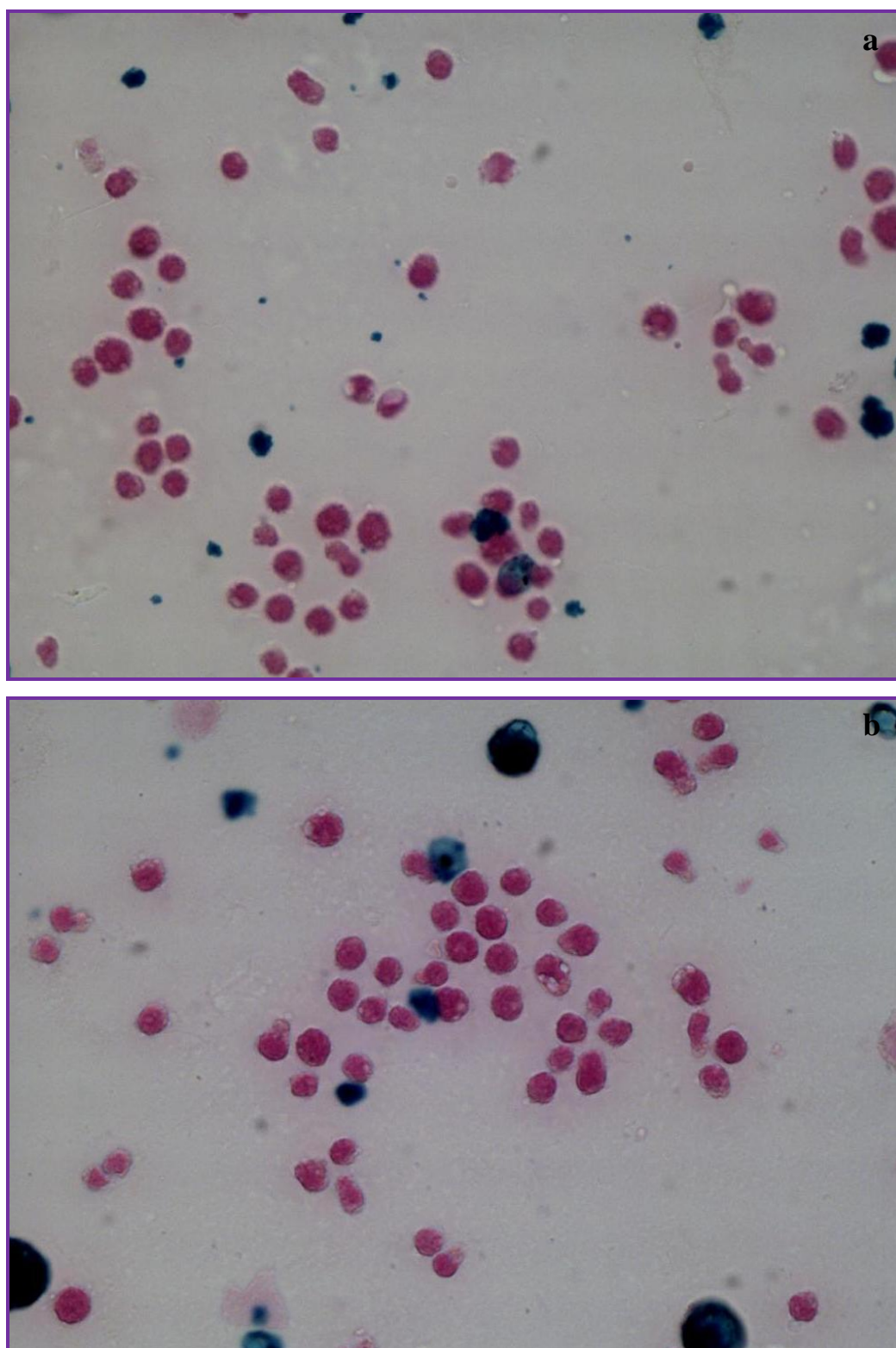
Nelle foto di figure 19 e 20 sono riportati i campioni ottenuti per incubazione delle cellule con i magnetoliposomi. In questo caso sono del tutto assenti le intense macchie blu dovute alla formazione di aggregati nanoparticellari, presenti invece nel campione trattato con la sola magnetite, mentre la presenza degli ioni ferrici risulta visibile dalla colorazione blu poco intensa e discontinua, caratterizzata dall'insieme di tanti piccoli puntini colorati, vicini tra loro.

La colorazione blu in questo caso è quasi sempre associata alle cellule e, chiaramente, non sovrapposta ad esse, ma, interna, come facilmente apprezzabile dai dettagli posti in evidenza nelle immagini.

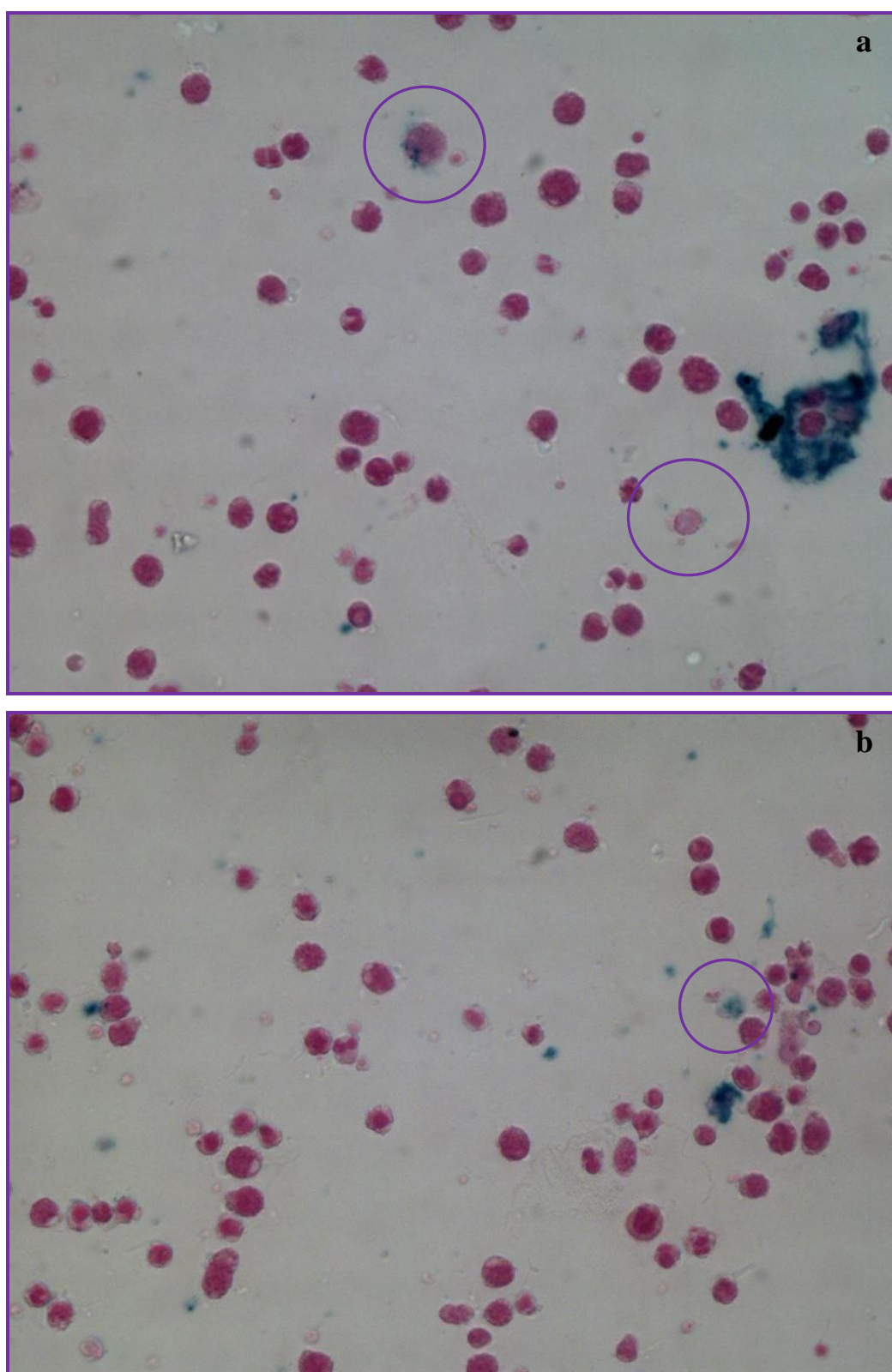
Le cellule puntinate di blu, inoltre, risultano chiaramente compromesse e sofferenti, o, in alcuni casi, già morte. La loro forma non è più circolare, e la colorazione completamente differente rispetto alle altre cellule.

Queste osservazioni sono totalmente in accordo con quanto dedotto dai risultati del saggio di citotossicità, ovvero una limitata interazione magnetite-cellule per applicazione della magnetite come tale, mentre un'elevata interazione per applicazione della magnetite attraverso i magnetoliposomi. L'innocuità della magnetite, valutata per applicazione della stessa in forma libera (non associata ai liposomi) è quindi correlata alla limitata interazione con le cellule, mentre risulta citotossica, in misura proporzionale alla concentrazione applicata, se associata ai liposomi. In questo caso, essendo notevole l'uptake cellulare verificatosi, l'addensarsi di ioni ferrici nell'ambiente cellulare ne ha consentito una concreta visualizzazione.

---

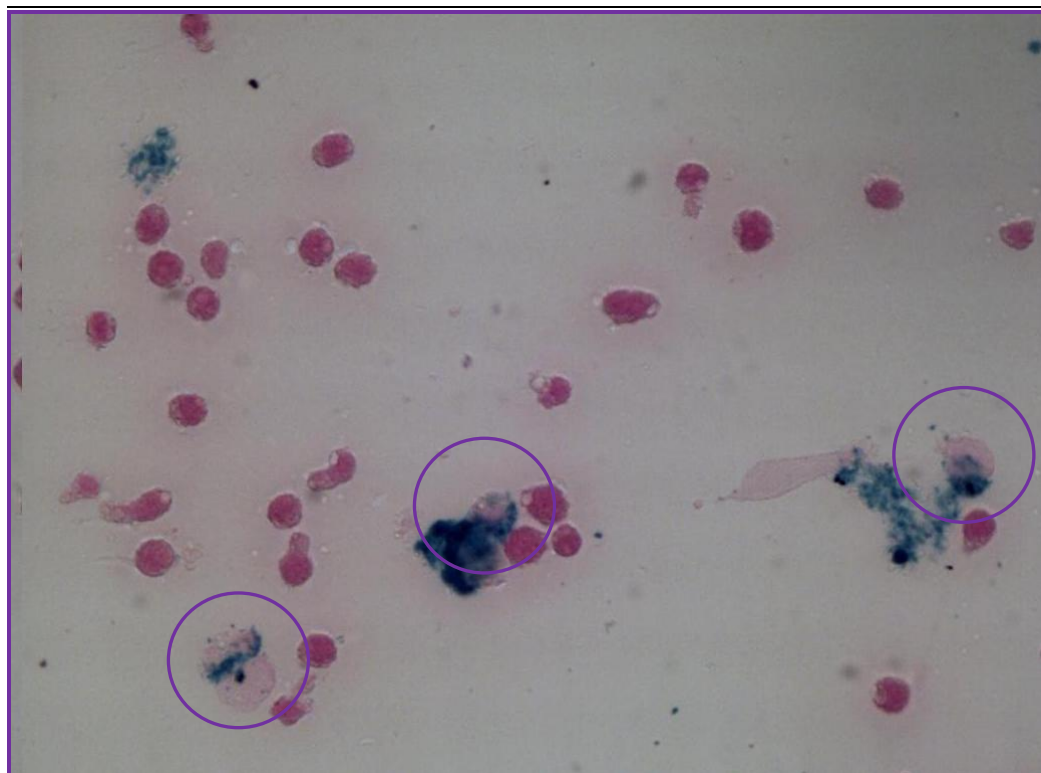


**Fig. 18 a) e b)** Visualizzazione al microscopio ottico delle cellule trattate con le HB\_SPION e sottoposte alla saggio del Blu di Prussia.



**Fig. 19 a) e b)** Visualizzazione al microscopio ottico delle cellule trattate con gli MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> e sottoposte alla saggio del Blu di Prussia.





**Fig. 20** Visualizzazione al microscopio ottico delle cellule trattate con gli MLP\_Ngp5<sub>cell</sub> e sottoposte alla saggio del Blu di Prussia.

### 3.3.6. *Valutazione dell'uptake cellulare mediante esecuzione del saggio della o-fenantrolina sulle cellule*

Inizialmente, si pensò di poter quantificare il ferro trattenuto nelle cellule mediante valutazione diretta dell'assorbanza allo spettrofotometro dell'esacianoferrato ferrico derivante dall'esecuzione del saggio del Blu di Prussia, come riportato in alcuni studi presenti in letteratura.<sup>8</sup> La metodica avrebbe previsto, dopo il trattamento con i componenti del saggio, la separazione per centrifugazione delle cellule dal terreno circostante e dai magnetoliposomi liberi e quindi la loro successiva rottura con DMSO; a tal punto, per mezzo di un'ulteriore centrifugazione sarebbe stato possibile separare i frammenti cellulari sul fondo della vial e valutare l'assorbanza del surnatante, ipoteticamente contenente il composto di nostro interesse. In realtà, tale metodica non è stata ritenuta attendibile, in quanto, durante le misure per la costruzione della retta di taratura dello spettrofotometro, a partire da soluzioni standard di magnetite, si è verificata, a distanza di 1-2 giorni, la formazione della tipica colorazione blu

---

anche nelle miscele di ferrocianuro di potassio-acido cloridrico, prive di magnetite, preparate come bianco bianco. Inoltre, le stesse soluzioni dal saggio sulla magnetite, pur presentando inizialmente una colorazione proporzionale alla concentrazione di ferro presente, sono divenute via via più scure con il passare dei giorni, fino a raggiungere tutte un colore finale, blu notte. E' stato quindi ritenuto opportuno limitare l'applicazione del saggio alla sola visualizzazione del ferro al microscopio ottico.

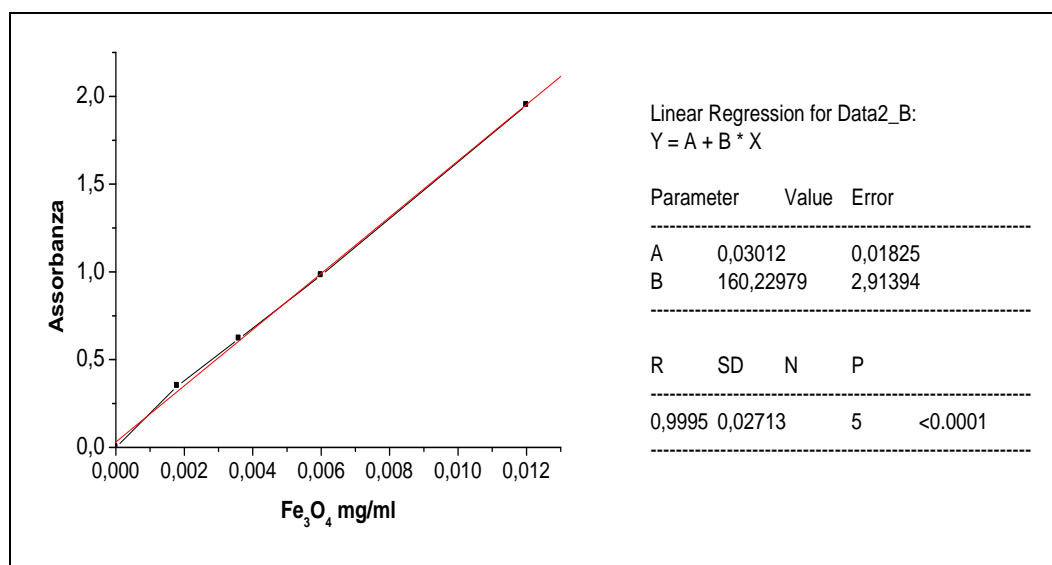
Successivamente sono state prese in considerazione altre metodiche riportate in letteratura, tra cui la magnetoforesi<sup>2,11</sup> e la verifica diretta dell'assorbimento delle nanoparticelle magnetiche allo spettrofotometro.<sup>1</sup> Tuttavia, non avendo a disposizione i mezzi per l'esecuzione della magnetoforesi ed avendo già escluso, in precedenza, la valutazione diretta allo spettrofotometro delle nanopartecelle magnetiche, si è pensato di ricorrere anche in questo caso al saggio della *o*-fenantrolina, nonostante la completa assenza in letteratura di precedenti esperimenti a riguardo.

Il saggio è stato eseguito secondo la procedura di paragrafo 3.3.7.2., ponendo a contatto con le cellule una quantità di magnetoliposomi tale da ottenere una concentrazione finale in magnetite pari a 0,155 mg/ml (anche esprimibile come: 0,67 mM in magnetite – 2 mM in ferro). Il coinvolgimento nel saggio di un pellet di cellule, al posto del classico campione iniziale di 0,1 ml, ha tuttavia richiesto una breve riflessione sul calcolo da eseguire per risalire alla quantità di magnetite contenuta nel pellet. In particolare, è stato necessario modificare la retta di taratura ponendo gli assorbimenti, invece che in funzione della concentrazione mg/ml di magnetite delle soluzioni standard di partenza, in funzione della concentrazione di magnetite reale ottenuta nella miscela finale del saggio stesso. Ovvero, a titolo di esempio: coinvolgendo 0,1 ml di una soluzione madre alla concentrazione di 0,09 mg/ml e portandoli a 5 ml totali per esecuzione del saggio, nella miscela finale si avranno esattamente 0,0018 mg/ml di magnetite; costruendo la retta in questo modo, mediante l'equazione della retta è possibile risalire alla concentrazione mg/ml di magnetite presente nella miscela del saggio e non nella soluzione di partenza sottoposta al saggio. Per ottenere quindi la quantità di magnetite totale presente nel pellet di partenza è

---

stato necessario moltiplicare la concentrazione calcolata per il volume della miscela del saggio.

Di seguito viene riportata la retta di taratura corrispondente a quella di Fig.12, capitolo 2, il cui assorbimento è stato posto, invece che in funzione della concentrazione della soluzione di partenza, in funzione della concentrazione di magnetite ottenuta nella miscela finale del saggio.



**Fig. 21** Retta di taratura della magnetite standard ottenuta mediante saggio della o-fenantrolina in cui l'assorbanza viene posta in funzione della concentrazione mg/ml di magnetite nella miscela finale del saggio.

L'esecuzione del saggio ha messo in evidenza un contenuto totale in magnetite nelle cellule pari a 6,5 µg che, divisi per il totale delle cellule presenti nel campione ( $5 \cdot 10^6$  cellule) danno luogo a 1,3 pg di magnetite/cellula, corrispondenti anche a 0,9 pg Ferro/cellula.

Relativamente alla quantificazione degli ossidi di ferro associati alle cellule,<sup>2, 11</sup> negli studi presenti in letteratura, da noi considerati come termine di paragone, si fa spesso riferimento al Ferro (III) in quanto, in questi casi, l'ossido di ferro utilizzato è stata la maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), caratterizzata appunto da soli ioni ferrici. Nel nostro caso invece è più corretto fare riferimento al 'ferro totale',



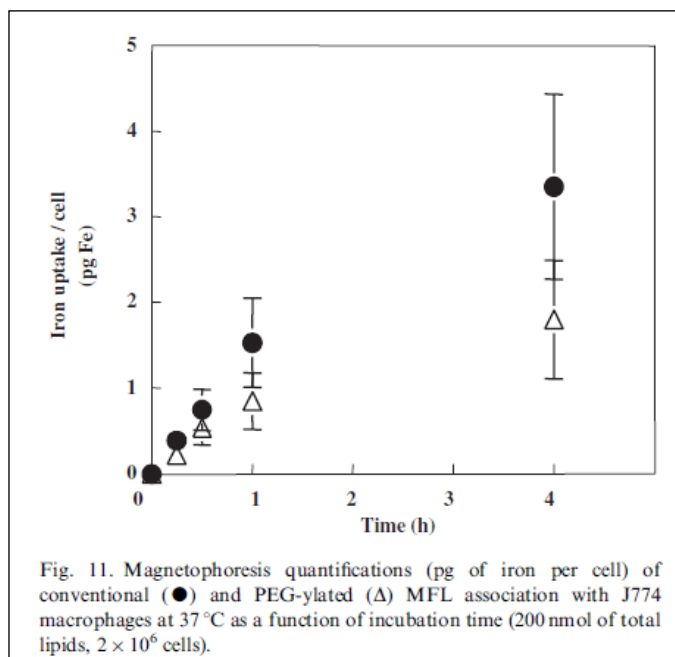
---

dato che la quantificazione ha riguardato tutti gli ioni del ferro presenti nella magnetite, sia ferrici che ferrosi. Ad ogni modo il ferro (III) rilevato per la maghemite è paragonabile al nostro ferro totale.

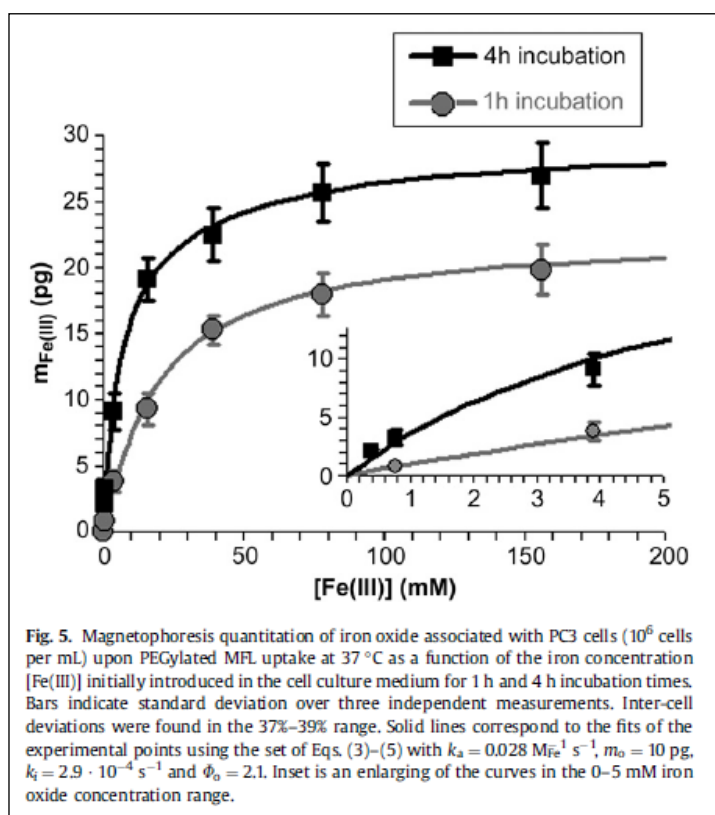
In base ai grafici di figura 22 e 23 relativi rispettivamente ai lavori di Martina et al. (2007)<sup>2</sup>, (2008)<sup>11</sup> è possibile quantificare mediamente l'uptake cellulare di ferro atteso per un tempo di incubazione pari a 2 h.

In particolare, l'uptake di ferro per cellula riportato in figura 22 è stato ottenuto per applicazione di una concentrazione in ossido di ferro pari a 0,5 mM (contro i 0,67 mM da noi applicati). Dato che il time-point alle 2h risulta essere assente è possibile prevedere un uptake per i sistemi magnetici peghilati compreso tra 0,9 e 1,8 pg Ferro/cellula. Mentre, osservando il grafico di figura 23 riportante sempre i pg di ferro/cellula in funzione della concentrazione in Ferro (III) applicata alle cellule, è possibile risalire ad un uptake di circa 2 pg/cellula per applicazione di sistemi vescicolari peghilati a concentrazioni in ferro pari a 2 mM (paragonabile alla concentrazione da noi applicata).

In relazione ai risultati riportati in letteratura, l'uptake da noi quantificato, pari a 0,9 pg ferro/cellula, risulta essere basso ma; considerando le variabili relative alle diverse linee cellulari e alla diversa metodica di quantificazione utilizzate è possibile considerare il valore di uptake ferro/cellula misurato attendibile.



**Fig. 22** Grafico riportato nello studio di Martina et al.<sup>2</sup> relativo all'uptake di ferro per cellula, misurato in picogrammi, in funzione del tempo di incubazione con i campioni magnetoliposomiali. La concentrazione in ossido di ferro applicata alle cellule attraverso i sistemi vescicolari è stata di 0,5 mM. L'andamento indicato con i triangoli trasparenti fa riferimento all'uptake seguente all'applicazione di sistemi vescicolari magnetici peghilati. In base all'andamento posto in evidenza è possibile risalire orientativamente all'uptake ottenibile in seguito ad un'incubazione di circa 2h.



**Fig.23** Grafico riportato nello studio di Martina et al.<sup>11</sup> relativo all'uptake di ferro per cellula, misurato in picogrammi, in funzione della concentrazione di ferro (III) applicata alle cellule. In base all'andamento posto in evidenza è possibile risalire, orientativamente, all'uptake ottenibile in seguito ad un'incubazione di circa 2h, per applicazione di una concentrazione in ferro pari a 2 mM.

---

### 3.4. Conclusioni e propositi futuri

Gli esperimenti svolti sulle cellule hanno permesso di evidenziare una citotossicità marcata per gli MLP\_Ngp se applicati al mezzo di coltura in concentrazioni elevate, rispettivamente  $\geq$  a 10  $\mu\text{g/ml}$  in magnetite e  $\geq$  a 0,2 mM in lipidi (EPC:DSPE-PEG<sub>2000</sub> 95:5 moli %). Tuttavia, per applicazione degli MLP\_Ngp alle cellule in rapporti tali da raggiungere nel mezzo di coltura una concentrazione in magnetite  $\leq$  a 4  $\mu\text{g/ml}$  ( $\leq$  0,08 in lipidi) gli MLP\_Ngp si sono mostrati non significativamente citotossici, dando luogo, alle 72 h, ad una riduzione della vitalità cellulare pari al 20%. A tal proposito, in futuro, sarebbe interessante verificare il trend relativo alla vitalità cellulare per applicazione degli MLP\_Ngp<sub>5cell</sub> in rapporti tali da raggiungere, nel mezzo di coltura, concentrazioni in magnetite e in lipidi intermedie rispetto a quelle da noi valutate. Un ulteriore studio potrebbe essere quello di verificare la citotossicità e l'uptake degli MLP\_Ngp su una linea cellulare differente. In base ai risultati raccolti con il saggio per la visualizzazione dell'uptake cellulare (Blu di Prussia) e il saggio della o-fenantrolina per la quantificazione dell'uptake cellulare del ferro, è possibile affermare con certezza l'effettiva interazione dei sistemi vescicolari magnetici con le cellule e la loro successiva internalizzazione. Tuttavia rimane attualmente un'interrogativo definire con certezza quali siano le minime concentrazioni in magnetite utili a sfruttare *in vivo* un targeting fisico e se queste, quindi, corrispondano alle concentrazioni fortemente citotossiche o a quelle più biocompatibili da noi valutate *in vitro*.

Non avendo attualmente i dati per rispondere a questo interrogativo è difficile definire i risultati da noi ottenuti come positivi o negativi. Tuttavia, tali studi preliminari hanno almeno messo in luce la possibilità, fino ad ora inesplorata, di applicare i sistemi vescicolari preparati con la magnetite idrofobica come potenziali carrier magnetici. Al fine di verificare, quindi, l'effettiva utilità degli MLP\_Ngp alle concentrazioni valutate come maggiormente biocompatibili, studi futuri potrebbero prevedere lo svolgimento di esperimenti *in vivo* mirati alla verifica del targeting fisico dei sistemi vescicolari magnetici preparati.

---

### ***Ringraziamenti***

Lo svolgimento dei saggi di citotossicità o di eventuali studi di approfondimento sui magnetoliposomi si sarebbero potuti realizzare in un'università straniera, come spesso accade durante i percorsi di Dottorato. Ciò avrebbe sicuramente avvalorato il ciclo di studi da me svolto e favorito lo scambio interculturale; tuttavia, non concretizzandosi entro i tempi prestabiliti la possibilità di un periodo di studio all'estero attinente a ciò da me svolto, l'occasione di scambio culturale e di accrescimento si è venuta a presentare più vicino di quanto mi aspettassi. Infatti, grazie alla disponibilità offertami dal Dott. Fabrizio Angius, dalla Dott.ssa Claudia Mulas e dal Prof. Giacomo Diaz del *Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, sezione di Patologia Sperimentale, dell'Università di Cagliari*, nonché allo spirito sempre vivo di collaborazione, è stato possibile svolgere gli studi di citotossicità sui magnetoliposomi. Con piacere, infatti, posso dire di aver trovato dei validi e stimolanti collaboratori e di aver trascorso una bella esperienza sia a livello umano che scientifico.

---

## Bibliografia

- 1 M. S. Martina, J.P. Fortin, C. Mènager, O. Clément, G. Barratt, C. G. Madelmont, F. Gazeau, V. Cabuil, S. Lesieur, *Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging* J. Am. Chem. Soc. 127 (2005), 10677-10682.
- 2 M.S. Martina, V. Nicolas, C. Wilhelm, C. Menager, G. Barratt, S. Lesieur, *The in vitro kinetics of the interactions between PEG-ylated magnetic-fluid-loaded liposomes and macrophages* Biomaterials 28 (2007), 4143-4153.
- 3 G. Diaz, M. Melis, A. Musin, M. Piludu, M. Piras and A.M. Falchi, *Localization of MTT formazan in lipid droplets. An alternative hypothesis about the nature of formazan granules and aggregates* Eur. J. Histochem. 51 (2007), 213-218.
- 4 B. Schopf, T. Neuberger, K. Schulze, A. Petri, M. Chastellain, M. Hofmann, *Methodology description for detection of cellular uptake of PVA coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) in synovial cells of sheep*. J. Magn. Magn. Mater. 293(1) (2005), 411-418.
- 5 S.J.H. Soenen, E. Illyes, D. Vercauteren, K. Braeckmans, Z. Majer, S. C. De Smedt, M. De Cuyper, *The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes* Biomaterials 30 (2009), 6803–6813.
- 6 Tesi dottorale Martina Pilloni, *Sintesi e Caratterizzazione di Nanocompositi Per Applicazioni Biomediche* (2009), pagg. 112-117.
- 7 J.P. Fortin-Ripoche, M.S. Martina, F. Gazeau, C. Mènager, C. Wilhelm, J. C. Bacri, S. Lesieur, O. Clément, *Magnetic Targeting of Magnetoliposomes to Solid Tumors with MR Imaging Monitoring in Mice: Feasibility* Radiology: volume 239: Number 2 (May 2006).
- 8 C. Yang, A. Rait, K. F. Pirollo, J. A. Dagata, N. Farkas, E. H. Chang, *Nanoimmunoliposome delivery of superparamagnetic iron oxide markedly enhances targeting and uptake in human cancer cells in vitro and in vivo* Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine Vol. 4 cap. 4 (2008) 318-329.
- 9 X. Zheng, J. Lu, L. Deng, Y. Xiong, J. Chen, *Preparation and characterization of magnetic cationic liposome in gene delivery* International Journal of Pharmaceutics 366 (2009), 211–217.
- 10 C. Cannas, A. Musinu, A. Ardu, F. Orrù, D. Peddis, M. Casu, R. Sanna, F. Angius, G. Diaz *CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> Core/Shell Nanoparticles: Magnetic and Spectroscopic Study* Chemistry of Materials 22 (2010) 3353–3361.
- 11 M. S. Martina, C. Wilhelm, S. Lesieur, *The effect of magnetic targeting on the uptake of magnetic-fluid-loaded liposomes by human prostatic adenocarcinoma cells* Biomaterials 29 (2008), 4137–4145.



---

## **4. Le nanoparticelle di chitosano**

### ***4.1. Scopo del lavoro***

L'obiettivo principale dello studio sulle nanoparticelle di chitosano/tripolifosfato di sodio è stato quello di mettere in evidenza l'influenza delle differenti modalità di radiazione ultrasonica sul diametro medio e sull'indice di polidispersione del nanocarrier ottenuto. La variazione della durata, dell'intensità e della modalità del ciclo della radiazione ultrasonica applicata ha permesso, infatti, di individuare il trattamento di sonicazione migliore al fine di riuscire ad ottenere un carrier dotato di buone caratteristiche per il rilascio sito specifico di farmaci.

La fase successiva è stata quella di verificare l'influenza dell'applicazione degli ultrasuoni per loro applicazione sulla sola dispersione di chitosano, invece che sull'intera miscela chitosano/TPP. Tale studio è stato svolto al fine di riuscire a sfruttare l'azione degli ultrasuoni, utile per ridurre e rendere omogeneo il diametro medio delle nanoparticelle, proteggendo al contempo, l'integrità di un ipotetico farmaco coinvolto nella preparazione, eventualmente addizionato alla soluzione di TPP non sottoposta a sonicazione. Di seguito, si è andati a verificare l'influenza del tipo di chitosano coinvolto e della concentrazione nella dispersione di partenza sul diametro medio del nanocarrier ottenuto.

In ultimo, al fine di verificare le capacità di caricamento dei farmaci delle nanoparticelle di chitosano/tpp, sono state svolte delle prove di caricamento di una molecola proteica modello quale l'insulina.



---

## **4.2. Parte sperimentale**

### **4.2.1. Materiali**

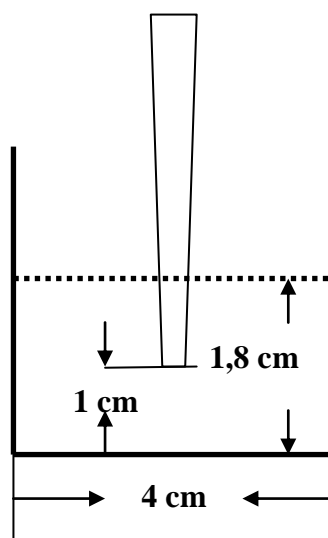
I materiali utilizzati sono stati il chitosano ad alto (>310 kDa), medio (190-310 kDa), basso (50-190 kDa) peso molecolare (Sigma Aldrich, USA), il tripolifosfato di sodio o TPP (Sigma Aldrich, USA), l'acido acetico (Fluka, Chemie CmbH, Switzerland), l'acido fosfotungstico (Merk, Germany) e l'insulina di pancreas bovino (Sigma Aldrich, USA).

### **4.2.2. Preparazione delle nanoparticelle di chitosano/TPP**

Le nanoparticelle di chitosano-TPP sono state preparate attraverso il metodo della gelificazione ionotropica. Sono state preparate dispersioni di chitosano a differenti concentrazioni (1, 2, 4, 7 e 10 mg/ml) in acido acetico all'1% (v/v); la soluzione di TPP (0,84 mg/ml) è stata aggiunta alla soluzione di chitosano in un rapporto volumetrico di 2:5 (TPP:chitosano). La sonicazione è stata eseguita mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore ultrasonico con sonda a immersione (Bandelin - sonoplus ultrasonic homogenizers HD 2070); il trattamento è stato svolto sulla miscela chitosano/TPP o, nella fase antecedente la formazione della miscela, nella sola dispersione di chitosano.

Le condizioni di lavoro al sonicatore sono state sempre costanti, come illustrato nell'immagine di fig. 1. Dato l'obiettivo del lavoro è stata particolare attenzione all'esatto posizionamento della sonda rispetto alla dispersione e alla ripetibilità delle condizioni di lavoro. Le dimensioni medie e il potenziale zeta sono state misurate dopo 24 h dal trattamento di sonicazione mediante la tecnica del Dynamic Laser Light Scattering (DLS).

Nella fase successiva del progetto sperimentale è stata utilizzata come proteina modello l'insulina, direttamente solubilizzata nella soluzione di TPP in modo da raggiungere la concentrazione finale nella miscela chitosano/TPP di 0,2 mg/ml.



**Fig. 1.** Configurazione del sistema di reazione nel sonificatore sonoplus ultrasonic homogenizers HD 2070; il recipiente utilizzato ha capacità 50 mL.

#### 4.2.3. Trattamento agli ultrasuoni

La radiazione ultrasonica è stata emessa ad una potenza di 70 W; al fine di mettere in evidenza l'effetto di ciascun parametro ultrasonico sul sistema nanoparticellare, il tempo di sonicazione, l'ampiezza dell'onda e la modalità di ciclo sono stati modificati uno per uno. In particolare, la durata dei trattamenti eseguiti è stata di 1, 2, 4 e 8 minuti, a temperatura ambiente, senza l'utilizzo di un bagnetto termostato a contatto con il recipiente di reazione. Sono state inoltre applicate onde ultrasoniche con valori di ampiezza del 10, 25 e 50%, rispetto ai 210  $\mu\text{m}$  massimi permessi dallo strumento. Le modalità di ciclo applicate sono state la modalità continuata, caratterizzata dalla sola radiazione ultrasonica costante, e la modalità discontinua, caratterizzata dalla radiazione ultrasonica intervallata da periodi di pausa di durata decrescente al crescere del ciclo applicato (ciclo 1, 4, 7). Questi parametri sono stati abbinati tra loro per un totale di 48 trattamenti.

---

#### *4.2.4. Determinazione del diametro medio e della distribuzione dimensionale delle nanoparticelle*

Il metodo utilizzato per la misurazione del diametro medio e della distribuzione dimensionale delle nanoparticelle di chitosano-TPP è stato quello della DLLS.

Il campione viene illuminato da un raggio laser e le variazioni d'intensità della luce diffusa dal campione vengono misurate in funzione del tempo. Le variazioni d'intensità misurate dal detector sono generate dal movimento browniano delle particelle all'origine dello scattering. A parità di temperatura e di viscosità le particelle 'piccole' si muovono rapidamente – creando delle variazioni rapide dell'intensità di scattering – mentre le particelle 'grosse' si muovono più lentamente – creando delle variazioni d'intensità lente. Questo fenomeno è alla base della tecnica Dynamic Light Scattering. Grazie ad un auto correlatore, la velocità delle variazioni d'intensità viene misurata, e il coefficiente di diffusione delle particelle calcolato dalla funzione di correlazione. L'equazione di Stokes Einstein consente poi di convertire il coefficiente di diffusione in diametro idrodinamico. Il detector è posto a  $173^\circ$  rispetto al raggio incidente sul campione. La DLLS consente di ottenere inoltre una distribuzione dimensionale definita anche come Indice di Polidispersione (IP) che ci permette di rilevare il carattere mono o polidisperso del sistema sottoposto ad analisi. In linea generale un IP inferiore a 0,4 indica una popolazione particellare omogenea. L'analisi del potenziale zeta viene effettuata attraverso la tecnica dell'Electrophoretic light scattering, la quale consente di misurare la mobilità elettroforetica di particelle sospese in un liquido. Per misurare la mobilità elettroforetica delle particelle si applica un campo elettrico tra gli elettrodi della cella di misura contenente il campione che, al contempo, viene illuminata da un raggio laser. Le particelle cariche si spostano verso l'elettrodo di segno opposto, creando una variazione di frequenza della luce diffusa dal campione direttamente proporzionale alla mobilità elettroforetica. Per le particelle abbastanza piccole o di bassa densità il valore del Potenziale Zeta consente di predire la loro stabilità. In effetti, un valore di potenziale zeta elevato (i.e.  $<-30\text{mV}$  e  $>+30\text{mV}$ ) fa sì che le particelle rimangano lontane l'una dall'altra, respingendosi abbastanza da limitare al minimo il rischio di agglomerazione, aggregazione e/o flocculazione.<sup>1</sup> Tutte le formulazioni nanoparticellari sono state sottoposte ad analisi del diametro medio idrodinamico, dell'indice di polidispersione e del potenziale zeta a 24h dalla

---

---

preparazione; le misurazioni sui campioni, data la loro limitata opalescenza, sono state eseguite senza nessuna preventiva diluizione, eccetto i casi dove diversamente specificato. L'analisi su ciascun campione è stata eseguita tre volte e i valori riportati sono il risultato della media e della deviazione standard delle 3 serie.

#### 4.2.5. Separazione delle nanoparticelle, Resa % e Water Loading %

Le nanoparticelle sono state separate dal mezzo circostante per ultracentrifugazione; i campioni sono stati sottoposti a 40000 rpm per una durata di 30 minuti alla temperatura di 10°C. Le nanoparticelle separate sono state sottoposte ad una pesata diretta, subito dopo centrifugazione, e ad una pesata successiva ad essiccamento. L'essiccamento è stato ottenuto ponendo il centrifugato ad una temperatura di 50°C, fino al raggiungimento di un peso costante. In questo modo è stato possibile calcolare la **Resa % (R%)** e la **water loading (w<sub>L</sub>%)** le quali sono il risultato delle seguenti equazioni:

$$R\% = \frac{P_e}{P_t} \times 100 \quad (1)$$

$p_e$  = peso delle nanoparticelle ottenuto dopo essiccamento  
 $p_t$  = peso teorico iniziale delle nanoparticelle

$$w_L\% = \frac{P_e}{P_c} \times 100 \quad (2)$$

$p_e$  = peso delle nanoparticelle ottenuto dopo essiccamento  
 $p_c$  = peso delle nanoparticelle ottenuto post-centrifugazione

#### 4.2.6. Analisi FTIR

Le analisi di spettroscopia infrarossa FT-IR sono state eseguite utilizzando uno spettrofotometro Bruker modello Vector 22. I campioni liofilizzati sono stati micronizzati insieme a polvere di KBr e compressi in dischi ad una forza di 10 kN per 2 minuti utilizzando una pressa manuale. Gli spettri FT-IR sono stati registrati nella regione dello spettro che va da 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

---

---

#### 4.2.7. *Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)*

La morfologia delle nanoparticelle di chitosano è stata osservata attraverso un TEM (JEOL, 200CX, Japan), il campione è stato caricato su delle grigliette Cu/C 'formvar' e ivi lasciato per 15-20 minuti circa. Di seguito, il campione in eccesso è stato rimosso dalla griglietta mediante della carta assorbente e, al fine di fissare e rendere visibile al TEM il campione di natura organica, una goccia di acido fosfotungstico all'1% è stata su di essa gocciolata e ivi lasciata per un tempo di 2 minuti.

#### 4.2.8. *Analisi HPLC ed associazione % dell'insulina alle nanoparticelle chitosano/TPP*

La quantità di insulina è stata misurata alla lunghezza d'onda di 215 nm utilizzando un cromatografo Alliance 2690 (Waters) dotato di un detector a fotodiodi e di un sistema computerizzato di integrazione dei dati (Millennium 32). E' stata utilizzata una colonna Sunfire C18 3,5 µm (dimensioni 4,6 x 150 mm) (Waters, Ireland). Come fase mobile è stata impiegata una miscela TPP/CH<sub>3</sub>CN 30:70 v/v.

La quantità di insulina associata alle nanoparticelle è stata calcolata attraverso la differenza tra la quantità totale di insulina coinvolta nella formulazione e la quantità presente nella fase acquosa separata per centrifugazione. L'associazione % è stata determinata indirettamente mediante l'applicazione della seguente formula:

$$\text{Associazione \%} = \frac{\text{Q.tà totale di insulina} - \text{insulina libera presente nel surnatante}}{\text{Q.tà totale di insulina}} \times 100 \quad (3)$$

### 4.3. *Risultati e discussione*

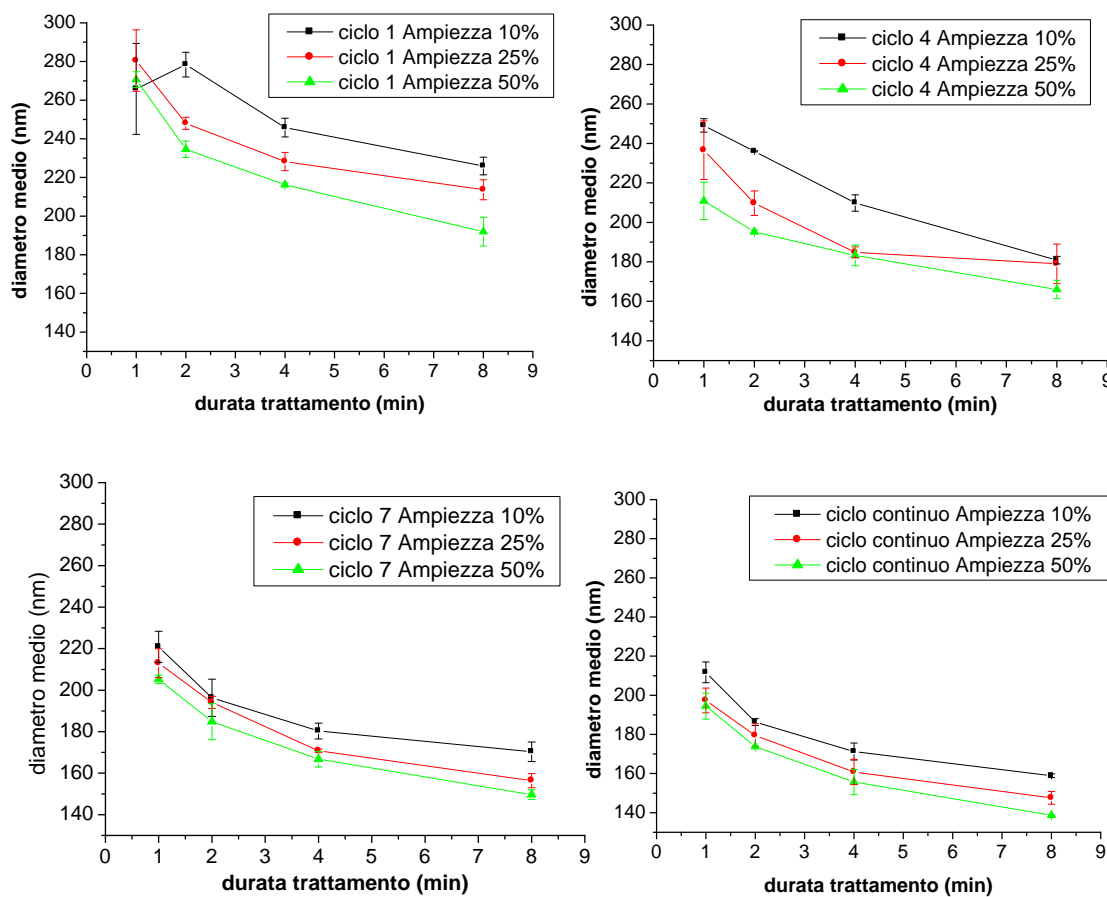
#### 4.3.1. *Effetto dei parametri di sonicazione applicati*

Tutti e tre i parametri modificati (ampiezza dell'onda, modalità del ciclo e durata di sonicazione) hanno mostrato avere un'importante influenza sulle dimensioni

---

delle nanoparticelle. L'aumento dell'ampiezza dell'onda, a valori costanti di modalità di ciclo e tempo di sonicazione, ha dato luogo ad una diminuzione del diametro medio delle nanoparticelle il cui andamento può essere meglio apprezzato per osservazione dei 3 simboli posti in corrispondenza di ciascun intervallo temporale, indicati nei grafici di Figura 2.

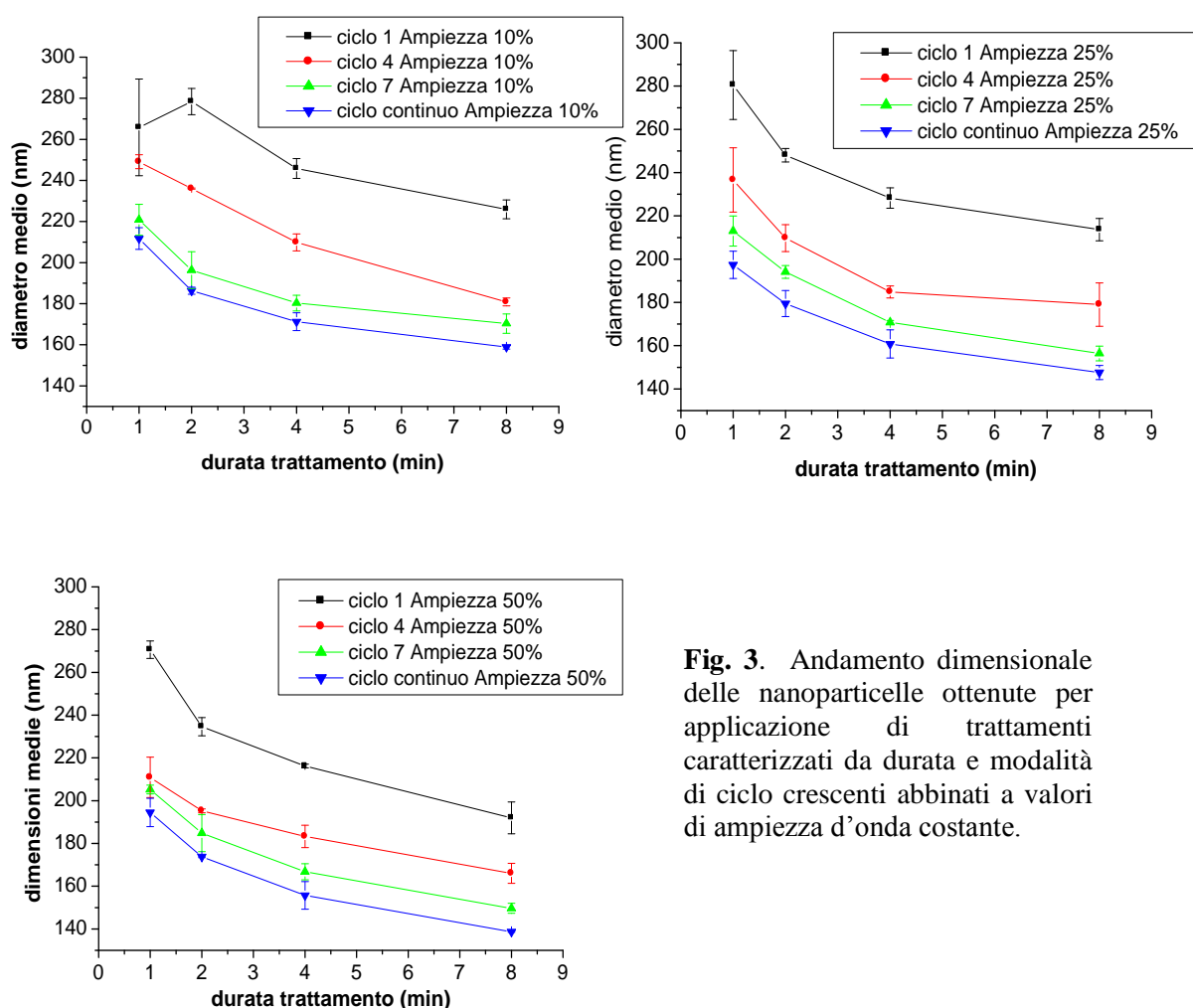
In questi quattro grafici sono riassunti tutti i valori dimensionali dei campioni ottenuti dall'applicazione dei 48 trattamenti ultrasonici, determinati dalla combinazione di 4 tipi di durata (1, 2, 4 e 8 minuti), 3 valori di ampiezza (10, 25 e 50%) e 4 modalità di ciclo.



**Fig.2.** Andamento dimensionale delle nanoparticelle ottenute per applicazione di trattamenti caratterizzati da durata e ampiezza dell'onda sonora crescenti abbinati a valori di ciclo costanti.

L'aumento della modalità di ciclo, a partire dal ciclo 1 (0,1 secondi di attività ultrasonica e 0,9 secondi di riposo) verso il ciclo continuo (1 sec di attività

ultrasonica), a valori costanti di ampiezza dell'onda e di tempo di sonicazione, ha dato luogo ad una diminuzione del diametro medio delle nanoparticelle il cui andamento risulta essere meglio apprezzabile nei grafici di Figura 3, attraverso l'osservazione dei 4 simboli, posti uno al di sotto dell'altro, in corrispondenza di un medesimo intervallo temporale. Anche in questo caso sono riassunti tutti i 48 risultati, graficati, però, in maniera tale da mettere meglio in evidenza l'effetto correlato alla variazione della modalità di ciclo.



**Fig. 3.** Andamento dimensionale delle nanoparticelle ottenute per applicazione di trattamenti caratterizzati da durata e modalità di ciclo crescenti abbinati a valori di ampiezza d'onda costante.

Osservando sia i grafici di figura 2 che quelli di figura 3 è chiara l'influenza della durata del trattamento sulle dimensioni medie delle nanoparticelle. L'aumento della durata del trattamento, infatti, indipendentemente dal tipo di



---

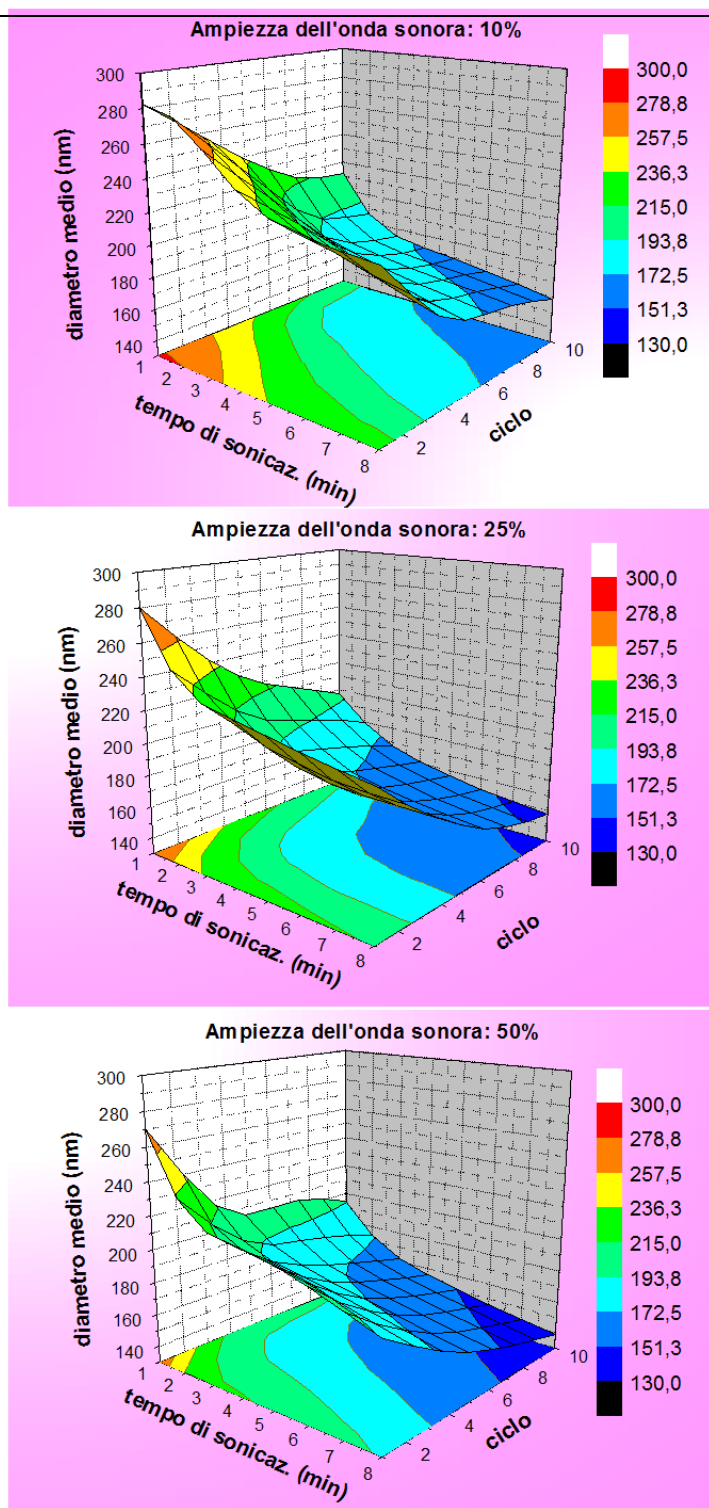
ciclo o dall'intensità dell'onda applicata, determina una riduzione del diametro medio degli elementi dispersi. E' risultato interessante rappresentare i risultati riportati in figura 3 attraverso dei grafici 3D, capaci di raffigurare contemporaneamente, mediante una superficie, il variare delle dimensioni al crescere della durata del trattamento e della modalità di ciclo (figura 4).

In questi 3 grafici è rappresentata una superficie piana inclinata negativamente, ad indicare la diminuzione delle dimensioni al crescere del tempo di sonicazione e della modalità di ciclo; come prevedibile, le dimensioni inferiori vengono raggiunte in corrispondenza della massima modalità di ciclo (ciclo continuo) e del tempo di sonicazione maggiore (8 minuti). È interessante osservare come le 3 superfici, all'aumentare dell'ampiezza abbinata (grafico a, b e c), vengano a trovarsi una al di sotto dell'altra e con curvature leggermente diverse; inoltre, le varie bande colorate presenti, visibili più chiaramente sulla superficie piana inferiore, mostrano le diverse popolazioni particellari formatesi.

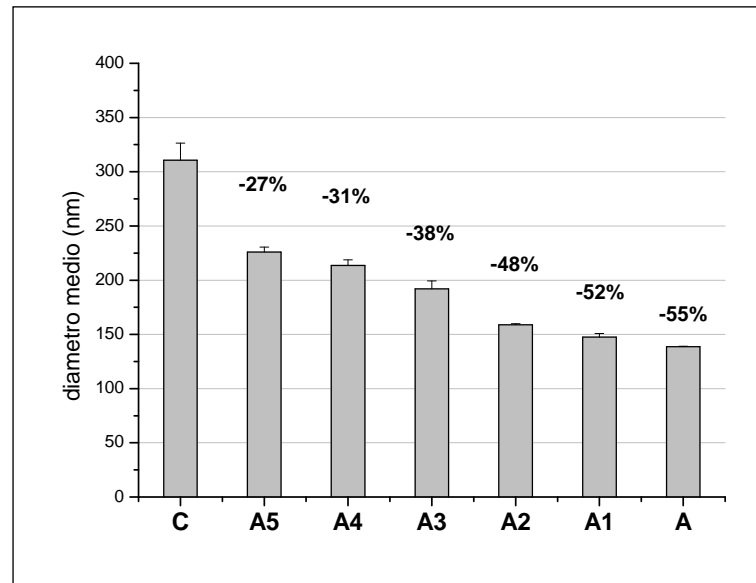
Andando dal grafico 4 a) verso il grafico 4 c) è facile osservare come le bande colorate si spingano verso l'angolo estremo di sinistra e lascino maggiormente posto alle bande corrispondenti ai range dimensionali inferiori.

In conclusione, attraverso l'applicazione del trattamento ultrasonico più intenso è stato possibile ottenere una riduzione del diametro medio idrodinamico pari a circa il 55% rispetto al controllo (miscela chitosano/TPP non sonicata), con dimensioni di partenza di circa 300 nm, come riportato nel grafico di figura 5.

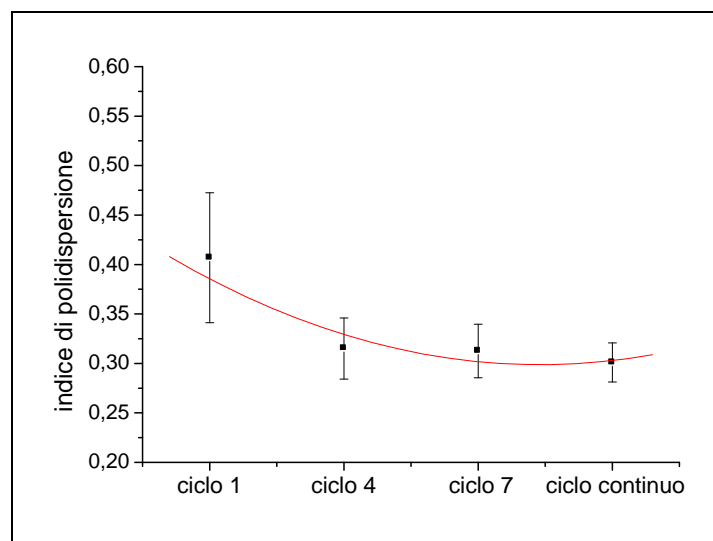
Proseguendo lo studio è stato valutato l'effetto degli ultrasuoni sull'indice di polidispersione dei sistemi nanoparticellari ottenuti; il parametro che sembra esercitare l'influenza maggiore sul grado di omogeneità del sistema è risultato essere la modalità del ciclo, nel grafico di Fig. 6 risulta infatti visibile l'abbassamento dell'indice di polidispersione all'aumentare di tale parametro.



**Fig. 4 a)** Andamento delle dimensioni medie delle nanoparticelle al crescere della durata del trattamento e della modalità di ciclo per un'ampiezza dell'onda sonora del 10%; **b)** Andamento delle dimensioni medie delle nanoparticelle al crescere della durata del trattamento e della modalità di ciclo per un'ampiezza dell'onda sonora del 25%; **c)** Andamento delle dimensioni medie delle nanoparticelle al crescere della durata del trattamento e della modalità di ciclo per un'ampiezza dell'onda sonora del 50%. [ciclo 10 corrisponde a ciclo continuo].



**Fig. 5** Riduzione dimensionale (%) ottenuta mediante l'applicazione dei trattamenti ultrasonici. C: controllo, miscela chitosano/TPP non sonicata; A: formulazioni sonicate, A5: ciclo 1, ampiezza 10%, durata 8 minuti; A4: ciclo 1, ampiezza 25%, durata 8 minuti; A3: ciclo 1, ampiezza 50%, durata 8 minuti; A2: ciclo continuo, ampiezza 10%, durata 8 minuti; A1: ciclo continuo, ampiezza 25%, durata 8 minuti; A: ciclo continuo, ampiezza 50%, durata 8 minuti.



**Fig. 6** Rappresentazione dell'andamento dell'indice di polidispersione all'aumentare della modalità di ciclo. I valori riportati sono le medie ottenute dai risultati dell'applicazione di diverse ampiezze dell'onda e di diversi tempi di sonicazione associati alle differenti modalità di ciclo.

La modalità di ciclo applicata sembra giocare, quindi, un ruolo fondamentale sia nei confronti del diametro medio (grafici figura 3) che dell'omogeneità del sistema ottenuto (figura 6). Tale influenza risulta sicuramente correlata allo

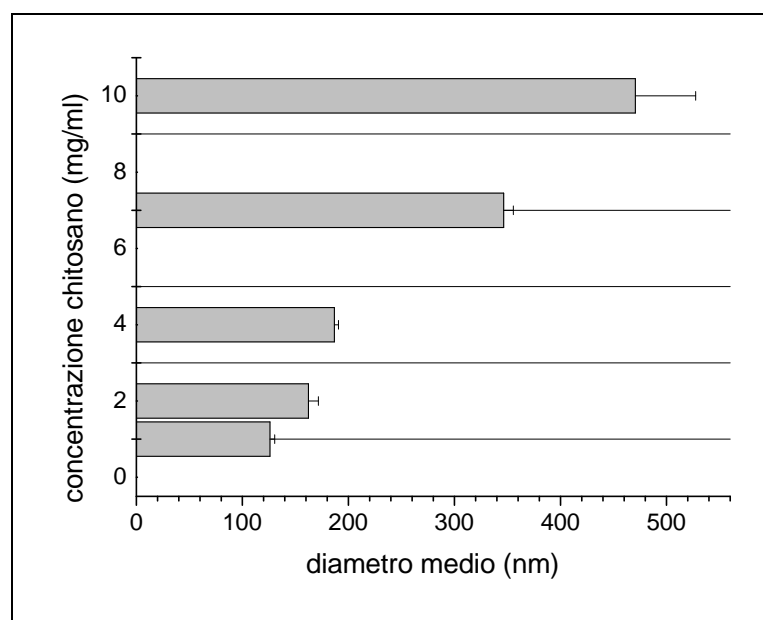
sviluppo crescente di calore conseguente all'aumento della modalità di ciclo applicata, che, raggiungendoci temperature sempre più elevate, facilita l'azione di degradazione operata dagli ultrasuoni sulle catene macromolecolari del chitosano e sui relativi aggregati nanoparticellari.

#### 4.3.2. *Effetto della concentrazione di chitosano*

Dopo aver studiato gli effetti dei parametri ultrasonici sul sistema nanoparticellare chitosano/TPP, è stato ritenuto opportuno proseguire nelle successive prove mediante l'applicazione del trattamento ultrasonico più efficace tra quelli da noi verificati, ovvero quello caratterizzato da ampiezza dell'onda pari al 50%, modalità di ciclo continua e durata 8 minuti (trattamento A).

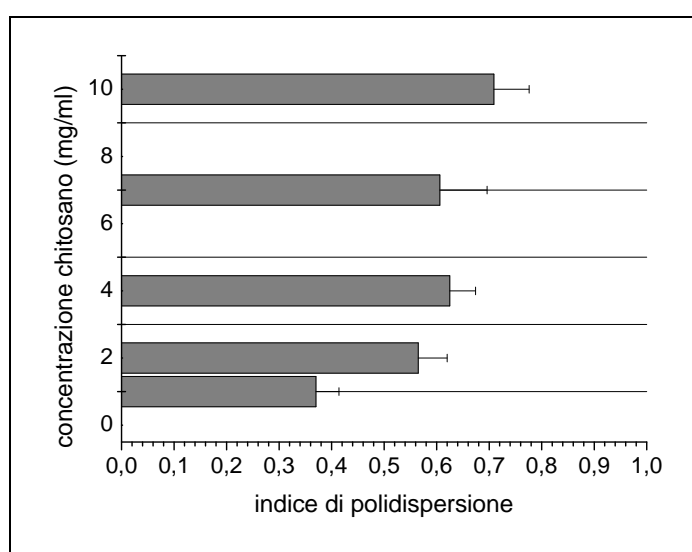
In questa fase si è voluta valutare l'influenza della concentrazione di chitosano nella dispersione di partenza nei confronti delle dimensioni medie delle nanoparticelle ottenute. A tal fine, sono state preparate cinque dispersioni in ac. acetico all'1% v/v con concentrazione di chitosano a basso peso molecolare pari a 1, 2, 4, 7 e 10 mg/ml.

L'analisi mediante DLLS è stata effettuata sui campioni diluiti 1:5 con PBS. I risultati ottenuti sono riassunti nel grafico di Fig. 7.



**Fig. 7.** Diametro medio idrodinamico dei campioni preparati a partire da dispersioni a concentrazione crescente di chitosano.

Anche la distribuzione dimensionale delle nanoparticelle aumenta all'aumentare della concentrazione di chitosano nella dispersione di partenza, come mostrato nel grafico di Fig. 8. Fino alla concentrazione di 4 mg/ml, il diametro medio delle nano particelle si è mantenuto al di sotto dei 200 nm; l'omogeneità del sistema, invece, ha mostrato significativi cambiamenti a partire dalla concentrazione di 2 mg/ml. Tali risultati hanno dimostrato e confermato che le basse concentrazioni di chitosano, inferiori o uguali a 2 mg/ml, risultano essere le più indicate per la preparazione di drug carriers.



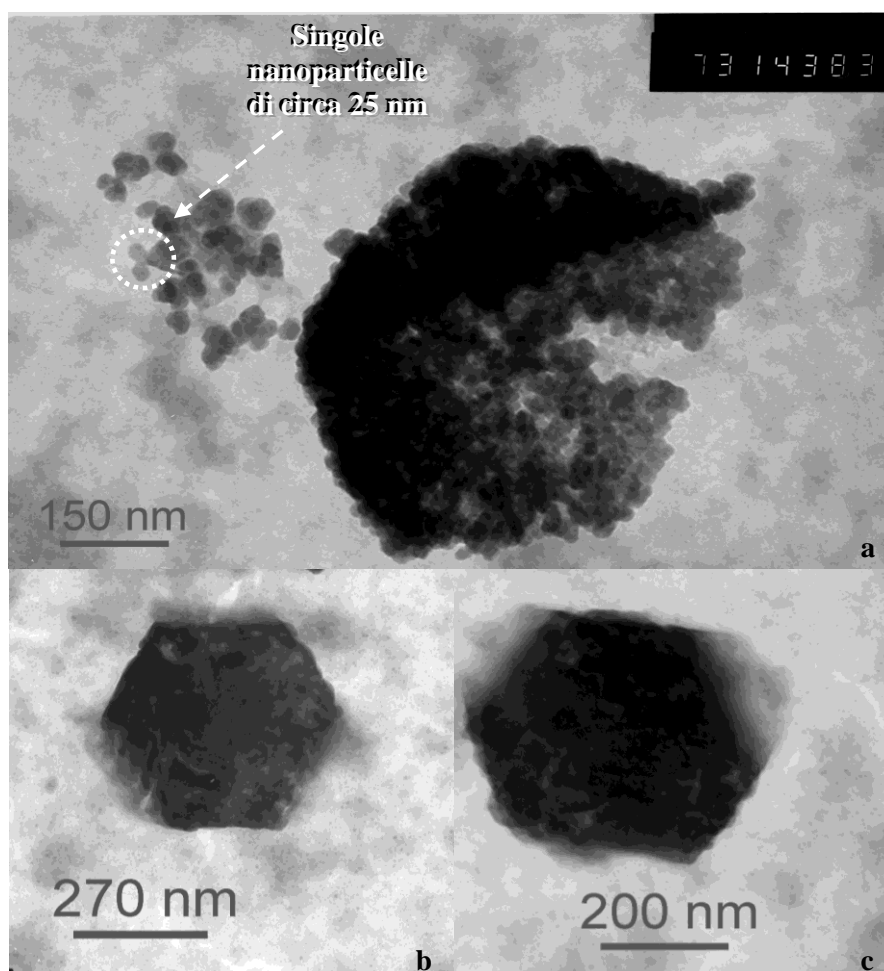
**Fig. 8** Andamento dell'indice di polidispersione delle nanoparticelle al crescere della concentrazione di chitosano nella dispersione di partenza.

#### *4.3.3. Caratterizzazione morfologica delle nanoparticelle*

A questo punto dello studio sperimentale, avendo evidenziato il tipo e la concentrazione di chitosano ottimali, nonché il trattamento ultrasonico più adeguato, è stato ritenuto opportuno valutare la morfologia delle nanoparticelle polimeriche preparate. La figura 9 a) mostra un'immagine TEM relativa alle nanoparticelle ottenute a partire da chitosano a basso peso molecolare, posto in dispersione alla concentrazione di 1 mg/ml e sonicato con il trattamento A. Nell'immagine 9 a) sono presenti delle nanoparticelle singole di circa 25 nm e un aggregato di discrete dimensioni dove si distinguono le singole unità costituenti, aventi dimensioni nanometriche molto simili tra loro. Gli aggregati assumono spesso particolari forme poliedriche come mostrato nelle foto di

figura 9 b) e c). Questo tipo di morfologia conferma quanto riportato negli studi di Lan et al. <sup>2</sup>, in cui si parla della formazione di ‘cluster’ nanoparticellari, ovvero aggregati di più nanoparticelle, e quanto riportato nel lavoro di Q. Gan et al.,<sup>3</sup> in cui sono mostrate foto TEM particolarmente simili alle seguenti.

La gelificazione ionotropica che si realizza per unione della soluzione di TPP alla dispersione di chitosano determina quindi, oltre che la formazione di nanoparticelle per gelificazione di più macromolecole polimeriche tra loro, l’ulteriore unione di più nanoparticelle responsabili della formazione dei cluster nanoparticellari.



**Figura 9** a) Immagine TEM delle nanoparticelle chitosano/TPP; b), c) dettagli su aggregati nanoparticellari dalla particolare forma poliedrica.

---

#### 4.3.4. Caratterizzazione FTIR delle nanoparticelle di chitosano/TPP

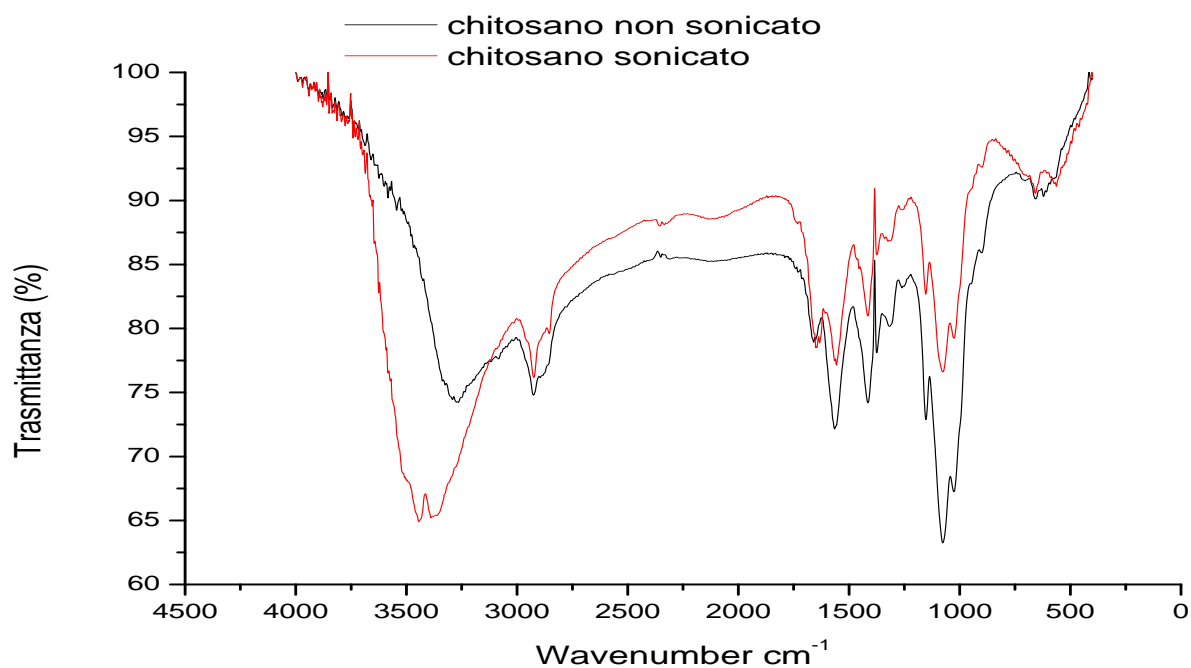
Al fine di approfondire l'interazione chitosano/TPP è stato ritenuto opportuno svolgere degli spettri FTIR. In particolare, inizialmente si sono volute verificare le differenze tra i campioni di chitosano sonicato e quello non sonicato (Fig.10). Gli spettri ottenuti sono risultati comparabili, suggerendo quindi l'assenza di modifiche chimiche a carico del polimero come riportato anche nello studio di Tang et al.<sup>4</sup>

Nello spettro del chitosano sono presenti principalmente 3 bande di assorbimento:  $3260\text{ cm}^{-1}$ ,  $1650\text{ cm}^{-1}$  e  $1092\text{ cm}^{-1}$ ; il primo picco è stato attribuito allo stretching dei gruppi  $\text{-NH}_2$  e  $\text{-OH}$  del chitosano; il secondo, a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , è stato attribuito al bending dell' $\text{NH}_2$  e allo stretching del CO del gruppo amidico, inoltre, intorno a  $1600\text{ cm}^{-1}$  si osserva la presenza di un altro picco ( $1570\text{ cm}^{-1}$ ) relativo al bending dell' $\text{NH}_3^+$ ; il terzo picco, a  $1092\text{ cm}^{-1}$  è stato attribuito allo stretching COC.

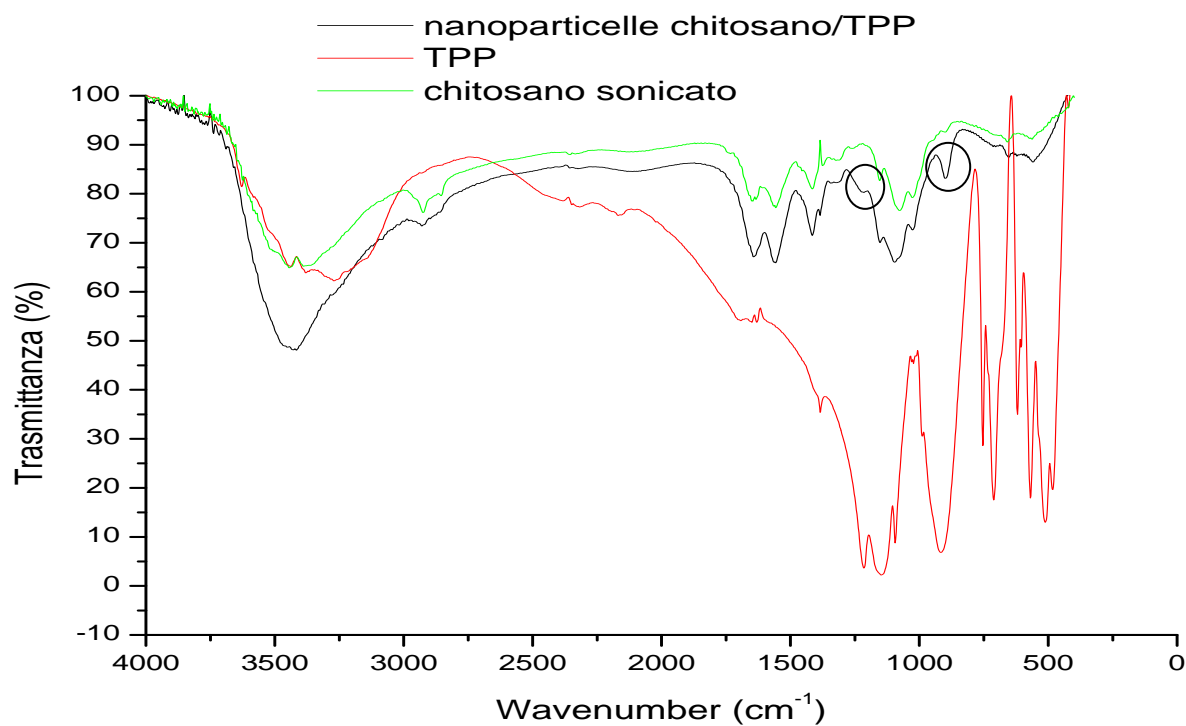
Il chitosano sonicato mostra il picco dello stretching dell'OH spostato da  $3260$  a  $3400\text{-}3450\text{ cm}^{-1}$ . Questo shift è probabilmente dovuto alla transizione dell'OH da una debole associazione intramolecolare ad uno stato fortemente associato; questa transizione, accompagnata da un'intensificazione del segnale, potrebbe essere dovuta al processo di sonicazione, il quale determinando la rottura delle catene, scinde il legame glicosidico  $\beta\text{ }1,4$ , presente tra le unità monomeriche del chitosano, con conseguente formazione di nuovi gruppi ossidrilici e ponti idrogeno.

Lo spettro FTIR delle nanoparticelle di chitosano (Fig.11) mostra, oltre ai picchi caratteristici del polimero, due picchi relativi alla presenza del tripolifosfato di sodio, il primo a  $900\text{ cm}^{-1}$  dovuto allo stretching POP e il secondo a  $1217\text{ cm}^{-1}$  legato a stretching del PO. Non essendo stati evidenziate variazioni importanti rispetto allo spettro del chitosano sonicato, si possono escludere cambiamenti chimici importanti a carico del polimero, confermando quanto già indicato in letteratura.<sup>4</sup>





**Fig. 10** Spettro FTIR del chitosano non sonicato e sonicato.



**Fig. 11** Spettro FTIR del chitosano sonicato, del TPP e delle nanoparticelle di chitosano/TPP.

---

#### *4.3.5. Effetto dell'applicazione degli ultrasuoni per sonicazione della sola dispersione di chitosano*

Al fine di proteggere dallo stress ultrasonico il farmaco destinato ad essere caricato nelle nanoparticelle di chitosano/TPP, l'applicazione degli ultrasuoni è stata eseguita sulla sola dispersione di chitosano. La scelta dell'inserimento di tale modifica nella procedura è scaturita da alcune valutazioni preliminari.

Come riportato in diversi studi, infatti, il farmaco viene spesso aggiunto alla soluzione di TPP,<sup>5,6</sup> la quale viene di seguito addizionata alla dispersione di chitosano; tale sequenza formulativa ha fatto quindi maturare la possibilità di sonicare esclusivamente le macromolecole del chitosano e solo successivamente indurre la formazione delle nanoparticelle per gelificazione ionotropica, abbinando la riduzione dimensionale indotta dagli ultrasuoni alla protezione del principio attivo dagli stress meccanici e termici.

L'applicazione degli ultrasuoni, nel nostro caso, è stata, quindi, semplicemente svolta nella fase antecedente la formazione della miscela chitosano/TPP.

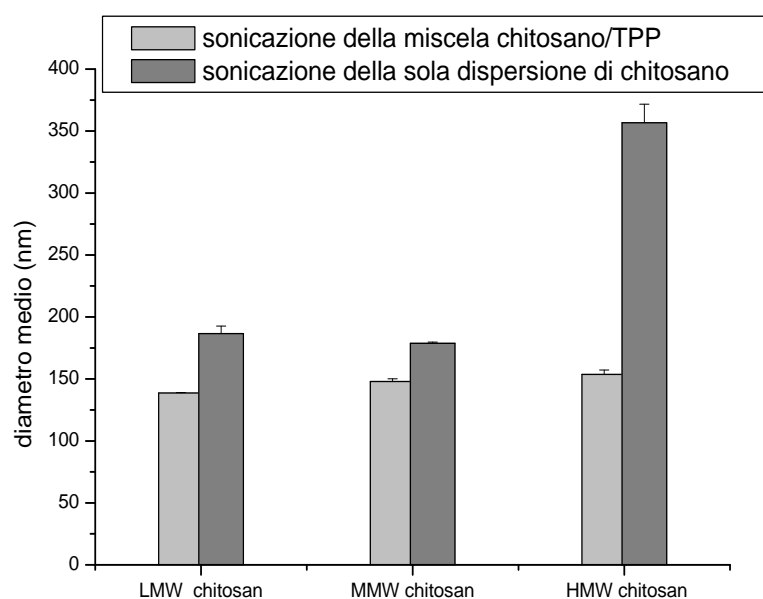
Nello specifico, lo studio è stato svolto applicando il trattamento di sonicazione con i parametri più intensi, già indicato in precedenza, sia sulle miscele chitosano/TPP che sulle sole dispersioni di chitosano, di seguito unite alla soluzione di TPP. In entrambi i casi le dispersioni sono state preparate a partire da 3 tipi di chitosano a peso molecolare crescente (low M.W., medium M.W. e high M.W.) e alla concentrazione di 1 mg/ml.

L'analisi DLLS delle miscele chitosano/TPP ottenute da entrambe le procedure ha dato luogo ai risultati riportati in figura 12. Come è possibile osservare dal grafico, le medie dimensionali ottenute con tutti e tre i tipi di chitosano sonicati nella miscela chitosano/TPP, risultano simili; le medie dimensionali invece presentate dalle miscele ottenute per sonicazione della sola dispersione di chitosano, risultano simili nel caso del chitosano LMW ed MMW, e molto differenti nel caso del chitosano HMW. Inoltre, le medie dimensionali ottenute per sonicazione della sola dispersione di chitosano risultano superiori rispetto a quelle ottenute per sonicazione dell'intera miscela; tuttavia, l'aumento delle diametro medio presentato dalle nanoparticelle ottenute a partire dal chitosani a

---

basso e medio peso molecolare (chitosano LMW ed MMW) non è mai superiore al 25-30%.

Quanto appena detto dimostra che l'applicazione degli ultrasuoni nella fase precedente la formazione della miscela, nel caso del chitosano a basso peso molecolare, può risultare utile ed efficace per ridurre e omogeneizzare il sistema nanoparticellare, anche se in misura leggermente inferiore rispetto a quanto ottenuto per applicazione della sonicazione sull'intera miscela.



**Figure 12** Diametro medio delle nanoparticelle di chitosano ottenute attraverso la sonicazione della miscela chitosano/TPP e della sola dispersione di chitosano.

Lo shift dimensionale rilevato tra i campioni ottenuti a partire dalle due procedure troverebbe una facile giustificazione sulla base di quanto riportato negli studi di Tsaih et al.<sup>7,8</sup> e Lan et al.<sup>2</sup>, i quali sostengono che l'azione della cavitazione sulla miscela di chitosano/TPP comporti oltre che la degradazione della struttura molecolare del chitosano anche la rottura dei 'cluster' nanoparticellari, riducendoli ad aggregati di più piccole dimensioni. Secondo quanto appena detto, nel caso dell'applicazione della sonicazione sulla miscela chitosano/TPP il fenomeno di cavitazione agirebbe sia sulle molecole di chitosano che sugli aggregati nanoparticellari, venutisi a creare in seguito alla formazione della miscela, generando quindi un duplice effetto; nell'applicazione

---

degli ultrasuoni sulla sola dispersione di chitosano, il fenomeno di cavitazione agirebbe invece esclusivamente sulla struttura molecolare del polisaccaride, dando luogo, quindi, ad un'azione meno efficace

*4.3.6. Effetto del peso molecolare del chitosano sul diametro medio, sul potenziale zeta, sull'indice di polidispersione e sulla resa % di nanoparticelle, ottenute per sonicazione della sola dispersione di chitosano*

Considerati i risultati positivi ottenuti per applicazione della sonicazione sulla sola dispersione di chitosano, si è voluto approfondire questo aspetto andando a monitorare oltre al diametro medio idrodinamico anche l'indice di polidispersione, il potenziale zeta e la resa % dei sistemi nanoparticellari così ottenuti (tabella 3), confrontandoli con gli stessi sistemi non sottoposti a sonicazione (tabella 2).

Come è possibile osservare dalla tabella 1, anche in questo caso sono state interessate tutt'e 3 le dispersioni di chitosano con, in aggiunta, una dispersione di chitosano a basso peso molecolare, posto in dispersione alla concentrazione di 2 mg/ml.

**Tabella 1**

<b>Formulazione</b>	<b>Chitos. HMW (%)</b>	<b>Chitos. MMW (%)</b>	<b>Chitos. LMW(%)</b>	<b>TPP (%)</b>	<b>Chitosano:TPP</b>
NpL1	-	-	0,07	0,02	3,5:1
NpM1	-	0,07	-	0,02	3,5:1
NpH1	0,07	-	-	0,02	3,5:1
NpL2	-	-	0,14	0,02	7,0:1

I risultati riportati in tabella 2, relativi ai campioni non sonicati, mostrano dei valori complessivi di partenza già potenzialmente buoni, ad eccezione delle NpH1. L'indice di polidispersione delle NpL1 è risultato praticamente identico a quello delle NpL2, sebbene queste ultime abbiano un diametro medio idrodinamico superiore. La resa % delle NpL1 e delle NpM1 è risultata simile. Il potenziale zeta, compreso tra i +50 e i +60 mV, come previsto dalla presenza del chitosano, conferma l'elevata stabilità del sistema disperso.

**Tabella 2**

<b>Formulazione</b>	<b>Ø medio (nm)</b>	<b>Ip</b>	<b>Potenziale zeta (mV)</b>	<b>Resa (%)</b>
NpL1	264,3 ± 2,1	0,48 ± 0,01	52,9 ± 1,4	42,3
NpM1	399,7 ± 26,1	0,80 ± 0,19	57,1 ± 0,6	40,7
NpH1	1234,0 ± 75,0	<i>n.d.</i>	58,4 ± 0,3	82,5
NpL2	334,9 ± 30,6	0,48 ± 0,02	61,7 ± 1,6	15,7

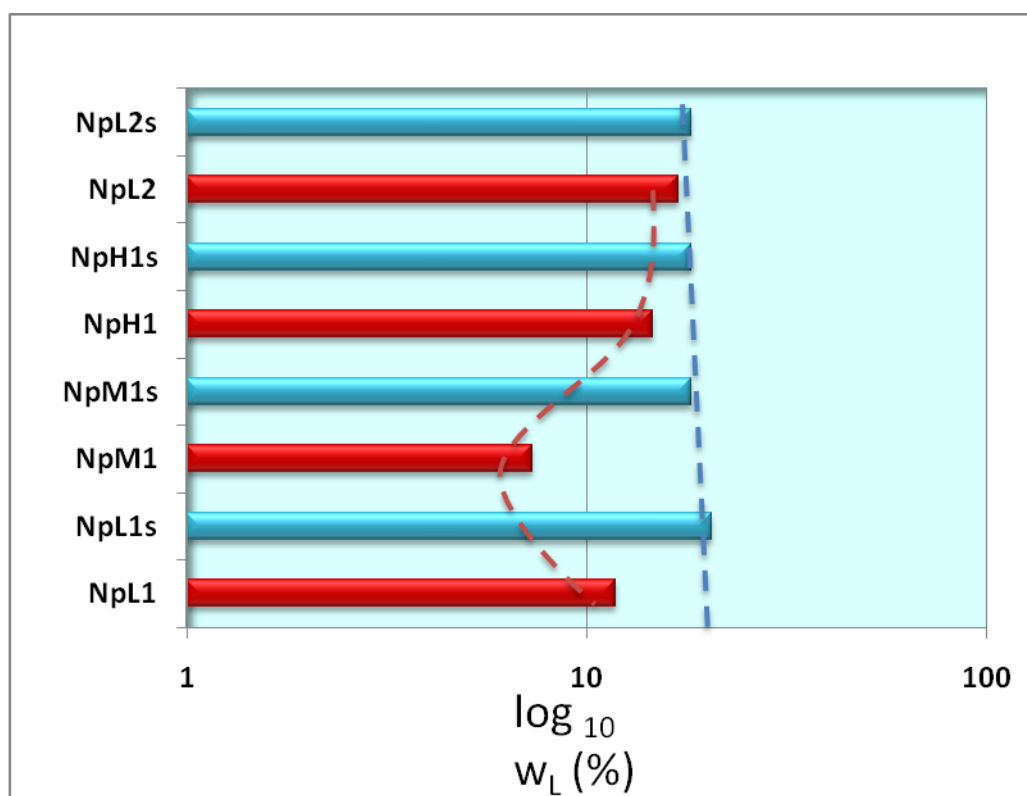
Nella tabella 3 sono riportati i risultati ottenuti per applicazione della sonicazione sulla sola dispersione di chitosano; come è possibile osservare le NpL1s e le NpM1s hanno confermato la loro somiglianza, già verificata nei campioni non sonicati. Le NpL2s, pur mostrando un diametro medio idrodinamico inferiore rispetto al campione non sonicato, hanno presentato delle dimensioni di gran lunga superiori a quelle delle NpL1s e NpM1s. Ciò nonostante, sia le NpL2s che le NpL1s e NPM1s hanno mostrato un buon indice di polidispersione, < a 0,4. Le NpH1s, invece, si sono discostate nettamente dalle altre formulazioni presentando sia diametro medio idrodinamico che IP molto superiori rispetto agli altri campioni. Il potenziale zeta è risultato leggermente inferiore rispetto ai campioni non sonicati.

**Tabella 3**

<b>Formulazione</b>	<b>Ø medio (nm)</b>	<b>Ip</b>	<b>Potenziale zeta (mV)</b>	<b>Resa (%)</b>
NpL1s	186,4 ± 6,0	0,35 ± 0,01	50,3 ± 1,2	42,8
NpM1s	178,7 ± 1,1	0,38 ± 0,01	50,1 ± 0,1	42,8
NpH1s	356,7 ± 14,9	0,48 ± 0,01	55,0 ± 0,3	68,7
NpL2s	262,6 ± 4,0	0,39 ± 0,03	56,5 ± 1,1	15,7

Un ulteriore valutazione della resa % è stata quella del water loading (%), il quale mette in relazione il peso post-essiccamento con il peso post-centrifuga presentato dalle nanoparticelle. In particolare, nel grafico di figura 13 sono riportati i risultati ottenuti dall'equazione 2 di pagina 179, posti in scala logaritmica, per le varie formulazioni indicate. Come è possibile osservare dal grafico, le barre celesti (corrispondenti ai campioni sonicati) presentano tutte circa lo stesso valore, come indicato dalla linea tratteggiata celeste, mentre le barre rosse (corrispondenti ai campioni non sonicati) mostrano valori differenti e

in linea generale inferiori rispetto alle precedenti. Questo andamento indica che il peso post-centrifuga dei campioni sonicati risulta meno variabile e inferiore a quello presentato dai campioni non sonicati. Questo fatto potrebbe essere giustificata dal fatto che i campioni non sonicati, presentando delle catene polimeriche meno frammentate e quindi più ingombranti e complesse, durante la centrifugazione inglobano una quantità di acqua superiore, successivamente persa per essiccamento; i campioni sonicati, invece, in cui le catene polimeriche risultano maggiormente frammentate, tendono ad inglobare una quantità di acqua sempre uguale, indipendentemente dal tipo di chitosano utilizzato per la creazione delle nanoparticelle.



**Fig. 13** Water loading (%), riportato in scala logaritmica, relativo alle varie formulazioni nanoparticellari.

#### 4.3.7. Ridispersione delle nanoparticelle separate per centrifugazione

La separazione delle nanoparticelle per centrifugazione può essere utile sia al fine di calcolare l'efficienza di caricamento di un eventuale farmaco coinvolto

---

nella preparazione, sia per dar luogo ad una preparazione in cui il principio attivo sia presente esclusivamente all'interno del carrier e non esternamente, sia infine per concentrare maggiormente le nanoparticelle. Anche le metodiche di spray drying<sup>9-13</sup> o di liofilizzazione<sup>9,14,15</sup> vengono comunemente utilizzate per la separazione delle nanoparticelle dal mezzo circostante; tuttavia, in questo modo non viene operata la purificazione del carrier dal farmaco libero.

A tal proposito, un punto particolarmente critico rilevato nelle fasi successive alla separazione delle nanoparticelle per centrifugazione è stata la loro successiva ridispersione in acqua. Le nanoparticelle, infatti, una volta separate sul fondo della vial, hanno dato luogo, per ridispersione in acqua, alla formazione di aggregati sopramolecolari e ad una dispersione nel complesso instabile e disomogenea. Ciò può essere dovuto al fatto che il chitosano di per sé non risulta essere disperdibile in soluzioni neutre e, inoltre, trattandosi di nanoparticelle di chitosano/TPP, la presenza dello ione tripolifosfato potrebbe determinare la maggiore compattazione delle stesse, al punto da renderne più difficoltosa la ridispersione. Fatte tali considerazioni è stato ritenuto interessante andare a valutare degli interventi che potessero potenzialmente aggirare l'ostacolo e permettere la ridispersione in un mezzo idrofilo.

Al tal fine, prendendo spunto dai lavori di A. H. Krauland et al.<sup>16</sup> e di Y. Aktas et al.,<sup>17</sup> sono state svolte delle prove di ridisperdibilità in presenza di acqua o acqua/glicerolo, valutando mediante DLLS i parametri dimensionali e di omogeneità del sistema disperso ottenuto.

In particolare, si è provato a porre un letto di glicerolo di 5 o 10 gtt sul fondo della vial destinata alla centrifugazione e su questo sono stati aggiunti 8 ml di campione; dopo centrifugazione si è separato il surnatante, cercando di non intaccare il glicerolo sottostante. Le nanoparticelle adese alla parete della vial sono state, quindi, riprese aggiungendo al glicerolo già presente una minima quantità di acqua e sottoponendo ad agitazione manuale e meccanica per 20-30 secondi. L'uso del glicerolo ha confermato i risultati attesi facilitando notevolmente la ridispersione del pellet di nanoparticelle.

I risultati migliori sono stati ottenuti mediante la disposizione di un letto di glicerolo di 10 gtt; la disposizione di un letto di glicerolo di 5 gtt, infatti, non ha



---

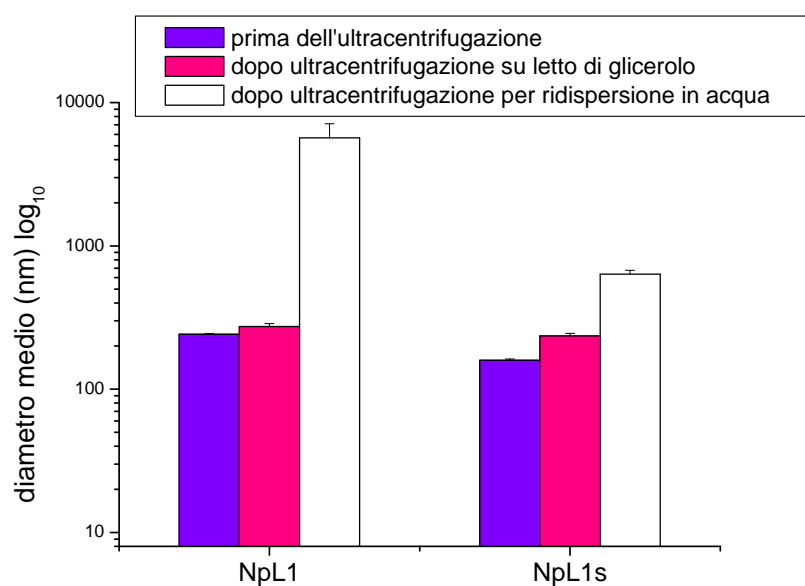
permesso la completa copertura del pellet di nanoparticelle formatosi, comportando una conseguente non facile ridispersione. Mediante il letto di glicerolo di 10 gtt, al contrario, il pellet di nanoparticelle è risultato quasi completamente immerso nel glicerolo presente e, in seguito alla separazione del surnatante, per aggiunta di una quantità di acqua pari a circa 2-3 ml, è risultato essere facilmente ridisperdibile. A tal proposito, di seguito, si riportano i risultati relativi ai campioni NpL1, NpL1s, NpL2s, NpM1s ed NpH1s (figg. 14,15) ottenuti per centrifugazione su letto di glicerolo (10 gtt). Come è possibile osservare dal grafico di figura 14, tale intervento ha permesso di ottenere delle dimensioni molto più vicine a quelle del campione di partenza rispetto a quanto invece accaduto per centrifugazione in assenza di glicerolo e semplice ridispersione in acqua.

Nel grafico a) di figura 15 sono indicati i valori di diametro medio idrodinamico precedenti alla centrifugazione e dopo centrifugazione su letto di glicerolo; come è possibile osservare, le dimensioni risultano essere tuttavia circa 50-100 nm superiori a quelle di partenza. Tale aumento potrebbe essere correlato alla formazione di una copertura superficiale di glicerolo sulle nanoparticelle che aumenterebbe il diametro medio idrodinamico. L'indice di polidispersione è risultato, invece, praticamente invariato. Il potenziale zeta è risultato meno positivo rispetto ai campioni di partenza; tale differenza va in qualche modo a confermare quanto ipotizzato relativamente al diametro idrodinamico, ovvero che il glicerolo si vada a disporre superficialmente alle nanoparticelle, determinando un abbassamento del potenziale zeta. La metodica così svolta, quindi, permette la reale separazione delle nanoparticelle dal surnatante e ne consente una successiva ridispersione. Tuttavia, la presenza del glicerolo nella dispersione impedisce l'eventuale applicazione successiva del processo di liofilizzazione. Tale processo potrebbe essere utile sia al fine di conservare a lungo termine le nanoparticelle, sia per un'eventuale diretta applicazione che per eseguire successivi studi, come ad esempio spettri di spettroscopia infrarossa.

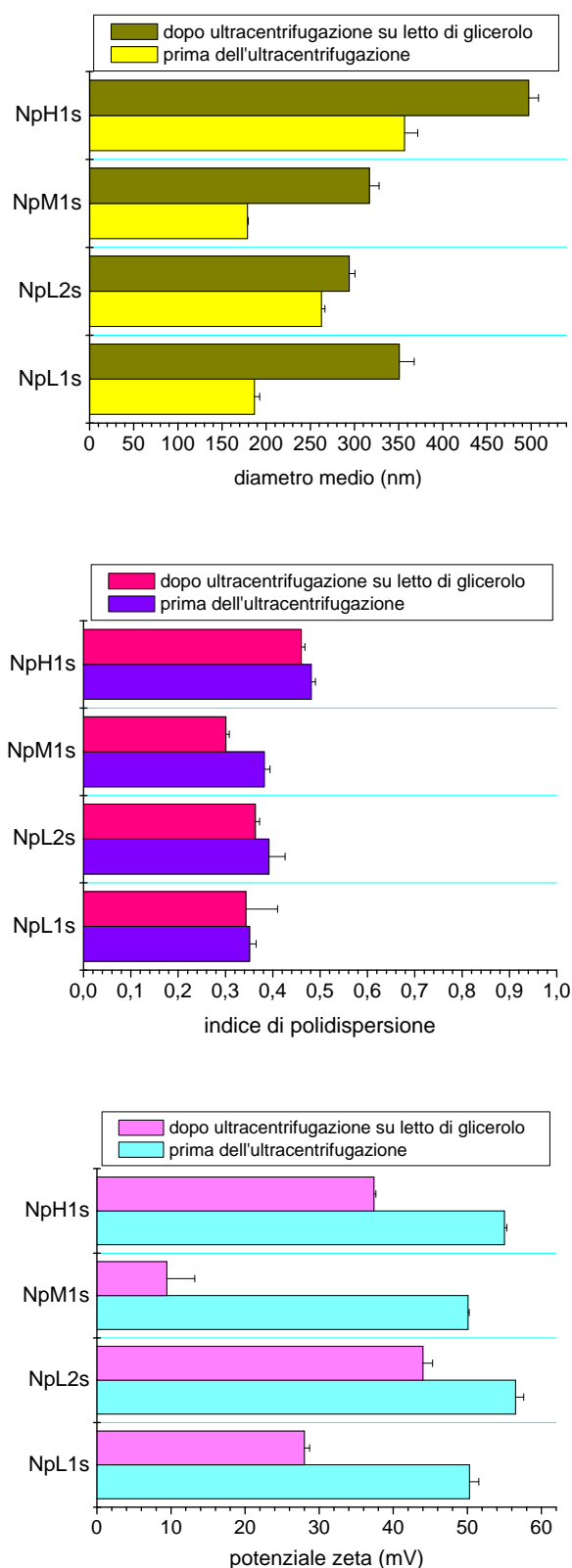
Data tale difficoltà si è pensato di provare a ridisperdere le nanoparticelle separate per centrifugazione in un piccolo volume dello stesso mezzo di partenza, caratterizzato dalla miscela chitosano/TPP in rapporto volumetrico 5:2.

---

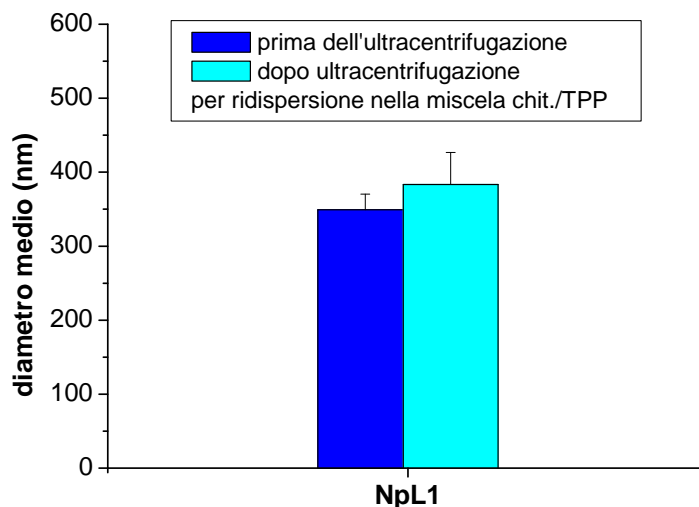
Come facilmente intuibile il pellet di nanoparticelle si è perfettamente ridisperso, dando luogo ad un campione con dimensioni simili a quelle di partenza (figura 16). In realtà questo passaggio, utilizzando per la ridispersione una miscela di chitosano/TPP priva di farmaco, potrebbe essere utilizzato per ridisperdere facilmente le nanoparticelle e al contempo consentirne la purificazione dal farmaco non associato.



**Fig. 14.** Analisi DLLS dei campioni NpL1 ed NpL1s prima del processo di centrifugazione, in seguito a centrifugazione su letto di glicerolo e ridispersione in acqua e per centrifugazione in assenza del letto di glicerolo e ridispersione in acqua.



**Fig. 15 a)** Diametro medio idrodinamico, **b)** IP e **c)** potenziale zeta delle nanoparticelle chitosano/TPP prima dell'ultracentrifugazione e per centrifugazione su letto di glicerolo e ridispersione in acqua.



**Fig. 16** Analisi DLLS di un campione NpL1 (non sonicato) prima dell'ultracentrifugazione e dopo ultracentrifugazione per ridispersione nel medesimo mezzo di partenza.

Per valutare l'importanza del pH della miscela o la presenza del TPP nel mezzo utilizzato per la ridispersione, ulteriori prove di ridispersibilità potrebbero essere successivamente svolte. In via teorica, attribuendo maggiore importanza al pH del mezzo utilizzato, rispetto alla presenza del TPP, ulteriori studi potrebbero andare a verificare la minima quantità di soluzione di acido acetico all'1% v/v necessaria al fine di permettere la ridispersione delle nanoparticelle. La problematica della difficile ridispersione, tuttavia, potrebbe non presentarsi affatto nel caso dell'utilizzo di chitosano modificato, in particolare dell' N-trimetil chitosano (TMC), il quale risulta parzialmente quaternarizzato e solubile in acqua, diversamente dal comune chitosano, solubile esclusivamente in soluzioni acide.<sup>9,18</sup>

#### 4.3.8. Prove di caricamento dell'insulina

Una volta giunti a questo punto dello studio sperimentale è stato ritenuto opportuno svolgere delle prove preliminari con una macromolecola proteica come l'insulina. Le prime prove svolte hanno riguardato la solubilità della molecola in esame; in particolare, l'insulina ha mostrato una scarsa solubilità in

---

---

acqua, inferiore a 0,01 mg/ml, mentre, ha mostrato un'ottima solubilità nella soluzione di tripolifosfato di sodio creata per la miscela chitosano/TPP.

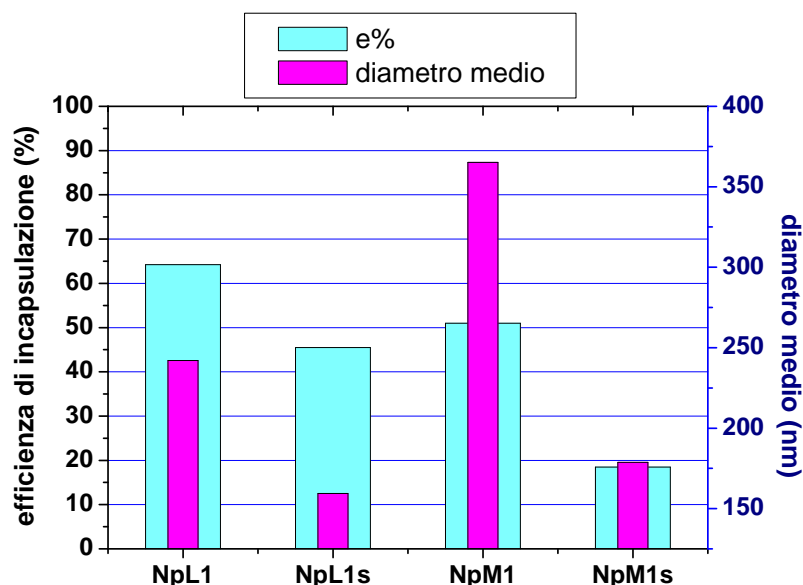
In realtà, l'aggiunta dell'insulina alla soluzione di TPP era già stata in precedenza ipotizzata, soprattutto in relazione alla procedura riportata al paragrafo 4.3.5., dove viene riportato lo studio sull'applicazione della sonicazione sulla sola dispersione di chitosano. L'elevata solubilità dell'insulina nella soluzione di TPP ha agevolato quindi lo svolgimento degli esperimenti. Nella soluzione di TPP è stata determinata una concentrazione di insulina pari a 0,7 mg/ml che, per diluizione con la dispersione polimerica, ha dato luogo ad una concentrazione finale pari a 0,2 mg/ml. Gli studi di caricamento dell'insulina nelle nanoparticelle di chitosano/TPP sono stati svolti sui campioni mostratisi in linea generale migliori, ovvero l'NpL1(s) e l'NpM1(s).

I campioni sono stati, quindi, sottoposti a centrifugazione e i surnatanti analizzati all'HPLC.

Come è possibile osservare dal grafico di figura 17 l'efficienza di caricamento dell'insulina, compresa tra il 50 e il 65%, è risultata maggiore nel caso dei campioni non sonicati, in accordo con quanto riportato in letteratura.<sup>17</sup>

I campioni sonicati hanno presentato, invece, una % compresa tra il 45 e il 20%. Nel grafico di figura 17 sono stati rappresentati sia l'efficienza di caricamento che il diametro medio idrodinamico delle formulazioni mettendo in evidenza, in questo modo, il campione dotato delle migliori caratteristiche sia dal punto di vista dimensionale che per quanto riguarda il caricamento del farmaco.

Il campione NpL1s è risultato essere quindi il migliore tra i 4 analizzati in quanto dotato delle migliori caratteristiche dal punto di vista dimensionale associate ad un'efficienza di caricamento soddisfacente.

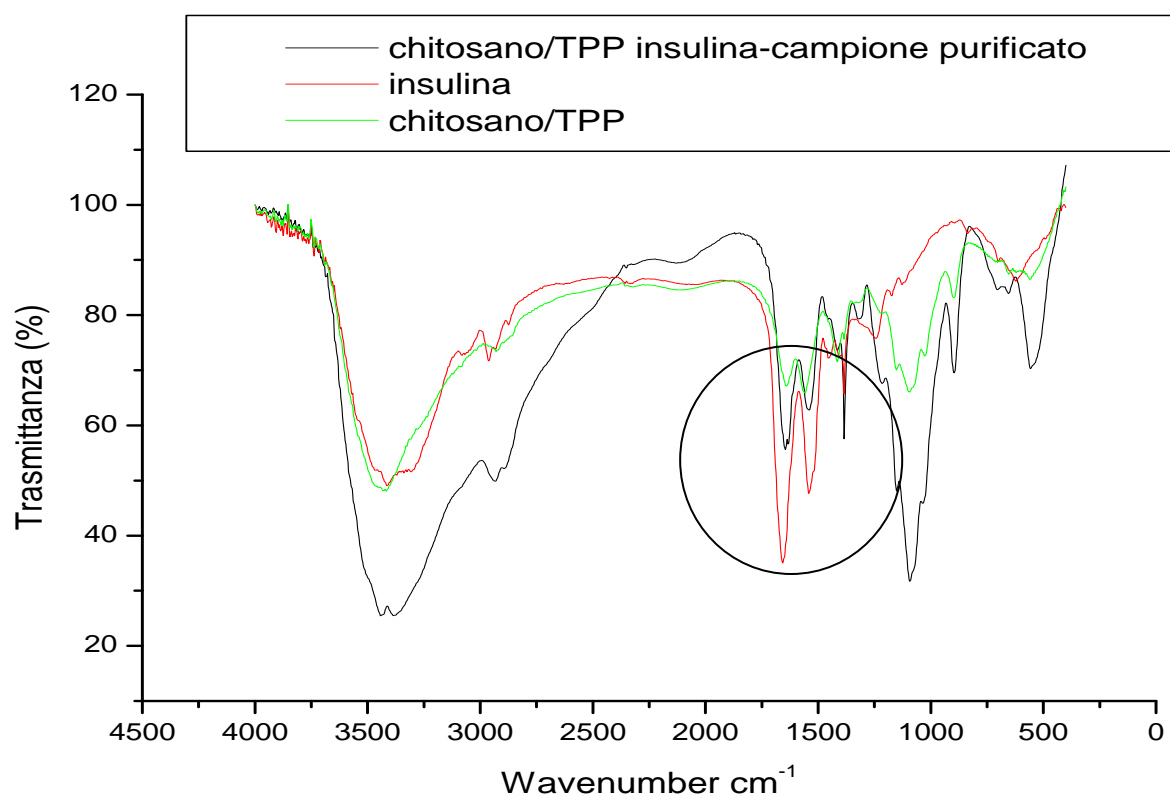


**Fig. 17** Diametro medio idrodinamico e efficienza di caricamento delle nanoparticelle di chitosano/TPP.

#### 4.3.9. Caratterizzazione FTIR delle nanoparticelle caricate con insulina

Osservando lo spettro FTIR dell'insulina riportato in figura 18 è possibile valutare i 2 picchi più caratteristici della proteina, il primo a  $1562\text{ cm}^{-1}$  (amide I) e, maggiormente, il secondo a  $1640\text{ cm}^{-1}$  (amide II) dovuti prevalentemente allo stretching del C=O. Entrambi i picchi sono però presenti anche nello spettro delle nanoparticelle di chitosano/TPP prive di farmaco; ciò che conferma l'effettiva presenza dell'insulina nel campione di nanoparticelle caricate con il farmaco è, in primo luogo, l'aumentata intensità dei segnali e, in secondo luogo, l'inversione dei due picchi. Nel caso delle nanoparticelle prive di farmaco risulta essere più intenso il picco a  $1562\text{ cm}^{-1}$  mentre nelle nanoparticelle caricate con il farmaco il picco più intenso è quello a  $1640\text{ cm}^{-1}$ , riproponendo lo spettro registrato per la sola insulina e confermando quanto già riportato in letteratura.<sup>19</sup> Il campione relativo alle nanoparticelle caricate con l'insulina è stato definito come 'purificato' in quanto, al fine di escludere l'influenza correlata alla presenza dell'insulina libera, il campione è stato precedentemente sottoposto a centrifugazione e risospeso in una miscela chitosano/TPP priva di farmaco e di seguito, quindi, liofilizzato.

I segnali rilevati nello spettro delle nanoparticelle di chitosano TPP con insulina (NpL1s insulina) dimostrano chiaramente il caricamento della proteina nel carrier polimerico senza presentare tuttavia nessuna modifica delle caratteristiche chimiche a carico delle nanoparticelle stesse.



**Fig. 18** Spettro FTIR dell'insulina, delle nanoparticelle chitosano/TPP e delle nanoparticelle chitosano/TPP caricate con insulina.

---

#### **4.4. Conclusioni e propositi futuri**

Lo studio dell'effetto del trattamento ultrasonico sui sistemi nanoparticellari di chitosano/TPP ha permesso di mettere in evidenza come tutti e tre i parametri ultrasonici modificati (ampiezza dell'onda, modalità di ciclo e durata) possiedano un'importante influenza sulle dimensioni medie e sull'omogeneità delle nanoparticelle ottenute. In particolare, l'aumento dell'ampiezza dell'onda, della modalità di ciclo e del tempo di sonicazione diminuisce il diametro medio delle nanoparticelle; inoltre, la modalità di ciclo ha mostrato svolgere un effetto superiore, rispetto agli altri parametri modificati, sull'indice di polidispersione del sistema nanoparticellare. Per applicazione del trattamento determinato dai parametri in durata, ampiezza dell'onda e modalità di ciclo più elevati è stata ottenuta una riduzione di circa il 55% in diametro medio, paragonato al controllo.

L'aumento della concentrazione di chitosano ha comportato un incremento del diametro medio e dell'indice di polidispersione delle nanoparticelle.

L'analisi TEM ha messo in evidenza le principali caratteristiche morfologiche di questi sistemi, i quali hanno mostrato la presenza di aggregati nanoparticellari aventi particolari forme poliedriche. L'analisi FTIR delle nanoparticelle di chitosano/TPP ha confermato l'effettiva presenza del TPP nelle nanoparticelle polimeriche preparate; tuttavia, lo spettro è risultato essere paragonabile a quello del chitosano sonicato, sottolineando l'assenza di particolari modifiche chimiche a carico del polimero.

L'applicazione degli ultrasuoni sulla sola dispersione di chitosano ha mostrato risultati interessanti, soprattutto relativamente alle formulazioni create a partire dal chitosano a basso e medio peso molecolare, le quali, dopo la formazione della miscela, hanno presentato un buon diametro medio e una buona omogeneità.

I risultati positivi ottenuti dalla caratterizzazione chimico-fisica di questi sistemi hanno confermato il loro elevato potenziale nel campo del drug-delivery; inoltre, la possibilità di applicare gli ultrasuoni sulla sola dispersione di chitosano ha messo in evidenza la possibilità di preservare il farmaco da eventuali stress termo-meccanici, e allo stesso tempo di permettere il raggiungimento delle

---



---

caratteristiche sia dimensionali che di omogeneità più adeguate al tipo di applicazione prescelta.

Quanto appena detto può essere molto importante per la preparazione di carrier destinati al caricamento di molecole sensibili, come per esempio le proteine.

A tal proposito, gli studi preliminari svolti sul caricamento dell'insulina hanno confermato l'ottima affinità di tali carrier polimerici verso le proteine.

Studi futuri potrebbero essere dedicati alla variazione della concentrazione di insulina applicata, al fine di aumentare la % associata al carrier polimerico, e al monitoraggio del rilascio in vitro.

Data la versatilità del carrier polimerico studiato, le applicazioni possibili potrebbero essere molteplici, tuttavia, considerate le elevate proprietà di mucoadesione e l'elevata propensione al caricamento di molecole proteiche, la via nasale e la via polmonare sembrerebbero essere le più interessanti.

Studi futuri potrebbero andare, quindi, ad approfondire l'applicazione dei carrier polimerici preparati in funzione del tipo di applicazione prescelta.

---

### ***Ringraziamenti***

Lo studio sulle nanoparticelle di chitosano è nato sulla base sia dei precedenti studi svolti sulle microparticelle di chitosano (titolo tesi di laurea “Gli ultrasuoni nella realizzazione di micro/nanoparticelle”), preparate mediante il metodo dell’emulsione acqua in olio, sia in seguito ad una ricerca bibliografica mirata a trovare una metodica più semplice e rapida rispetto a quella applicata, utile sempre alla preparazione di micro/nanocarrier a base di chitosano. Il lavoro di ricerca sulle nanoparticelle di chitosano, sviluppato in misura secondaria rispetto a quello dei magnetoliposomi, ha offerto, quindi, la possibilità di svolgere un tipo di indagine sperimentale completamente differente da quella del progetto principale, permettendo anche una variazione sui temi prevalentemente trattati e una più larga veduta sui drug delivery systems.

In particolare, per lo svolgimento del lavoro sulle nanoparticelle di chitosano, ci tengo a ringraziare la Dott.ssa Maria Cristina Meloni, la Prof.ssa Anna Maria Maccioni, il Prof. Carlo Anchisi, la Dott.ssa Francesca Marongiu e la Dott.ssa Donatella Valenti del *Dipartimento Farmaco Chimico Tecnologico dell’Università di Cagliari*; inoltre, ringrazio la Sig.ra Anna Saba, tecnico del *Dipartimento Scienze e Tecnologie Biomediche, sezione di Patologia sperimentale dell’Università di Cagliari* e la Dott.ssa Martina Pilloni del *Dipartimento di Scienze Chimiche dell’Università di Cagliari*. In ultimo, ringrazio la Prof.ssa Chiara Sinico e la Prof.ssa Anna Maria Fadda per la fiducia prestatami.

---

## Bibliografia

- 1 <http://www.alfatest.net/listing.asp?CatID=200>
- 2 J. Lan, Y. Yang, X. Li, *Microstructure and microhardness of SiC nanoparticles reinforced magnesium composites fabricated by ultrasonic method* Materials Science and Engineering A. 386 (2004), 284–290.
- 3 Q. Gan, T. Wang, C. Cochrane, P. McCarron *Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 44 (2005), 65–73.
- 4 E.S.K. Tang, M. Huang, L.Y. Lim *Ultrasonication of chitosan and chitosan nanoparticles* International Journal of Pharmaceutics 265 (2003) 103–114.
- 5 H. Katas, H. O. Alpar, *Development and characterization of chitosan nanoparticles for siRNA delivery* Journal of Controlled Release 115 (2006) 216–225.
- 6 A. H. Krauland, M. J. Alonso *Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system* International Journal of Pharmaceutics 340 (2007) 134–142.
- 7 M. L. Tsaih, L.Z. Tseng, R.H. Chen, *Effects of removing small fragment with ultrafiltration treatment and ultrasonic conditions on degradation kinetics of chitosan.* Polymer Degradation and Stability 86 (2004), 25–32.
- 8 M. L. Tsai, S. W. Bai, R. H. Chen, *Cavitation effects versus stretch effects resulted in different size and polydispersity of ionotropic gelation chitosan–sodium tripolyphosphate nanoparticle* Carbohydrate Polymers 71 (2008), 448–457.
- 9 M. Amidi, E. Mastrobattista, W. Jiskoot, W. E. Hennink, *Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens* Advanced Drug Delivery Reviews 62 (2010), 59–82.
- 10 A. Grenha, B. Seijo, C. Remunan-Lopez, *Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery* Eur. J. Pharm. Sci. 25 (2005), 427–437.
- 11 M. Yang, S. Velaga, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, L. Hovgaard, M. van de Weert, S. Frokjaer, *Characterization of salmon calcitonin in spray-dried powder for inhalation. Effect of chitosan* Int. J. Pharm. 331 (2007), 176–181.
- 12 T. P. Learoyd, J. L. Burrows, E. French, P.C. Seville, *Chitosan-based spray-dried respirable powders for sustained delivery of terbutaline sulfate* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 68 (2008), 224–234.
- 13 G. Durmaz, A. Ozkul, S. Senel, *Formulation of Chitosan Microparticles for Mucosal Immunization in Veterinary Medicine* Controlled Release Society 32<sup>nd</sup> Annual Meeting & Exposition TRANSACTIONS (2005), # 787.
- 14 S. Mao, U. Bakowsky, A. Jintapattanakit, T. Kissel, *Self-assembled polyelectrolyte nanocomplexes between chitosan derivatives and insulin* J. Pharm. Sci. 95 (2006) 1035–1048.

- 
- 15** D. Kim, Y. Jeong, C. Choi, S. Roh, S. Kang, M. Jang, J. Nah, *Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles* International Journal of Pharmaceutics 319 (2006) 130–138.
- 16** A. H. Krauland, M. J. Alonso, *Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system* International Journal of Pharmaceutics 340 (2007), 134–142.
- 17** Y. Aktas, K. Andrieux, M. J. Alonso, P. Calvo, R. N. Gürsoy, P. Couvreur, Y. C. apan, *Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor* International Journal of Pharmaceutics 298 (2005), 378–383.
- 18** Fu Chen, Zhi-Rong Zhang, Yuan Huang, *Evaluation and modification of N-trimethyl chitosan chloride nanoparticles as protein carriers* International Journal of Pharmaceutics 336 (2007), 166–173.
- 19** B. Sarmento, A. Ribeiro, F. Veiga, D. Ferreira, *Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 53 (2006), 193–202.